

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KATLYN BARP MEYER

**FUNÇÃO TESTICULAR EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*): ATIVIDADE DA
ENZIMA AROMATASE E ASPECTOS SAZONAIS DA ESTEROIDOGENESE E
ESPERMATOGÊNESE**

CURITIBA

2013

KATLYN BARP MEYER

**FUNÇÃO TESTICULAR EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*): ATIVIDADE DA
ENZIMA AROMATASE E ASPECTOS SAZONAIS DA ESTEROIDOGENESE E
ESPERMATOGÊNESE**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia, ao
Programa de Pós-graduação em Fisiologia,
Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Rosana Nogueira de
Morais.

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino
Andrade

CURITIBA

2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

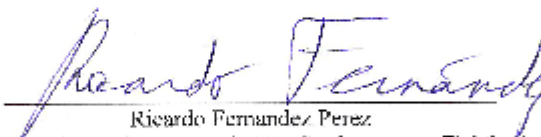


DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **KATLYN BARP MEYER** no dia 01 de abril de dois mil e treze, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Fisiologia, intitulada: "FUNÇÃO TESTICULAR EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*): ATIVIDADE DA ENZIMA AROMATASE E ASPECTOS SAZONAIS DA ESTEROIDOGÊNESE E ESPERMATOGÊNESE", com a banca examinadora constituída, pelos professores: Professor Doutor Marco Aurélio Romano (Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO), Professor Doutor Paulo Roberto Dalsenter (Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná - UFPR) e Professora Doutora Rosana Nogueira de Moraes (Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná - UFPR), como orientadora e presidente da Banca Examinadora. Tendo sido Aprovada, sendo que a emissão do diploma da mesma encontra-se em processo de tramitação ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação. Esta Declaração tem validade por 60(sessenta) dias, a partir da data de emissão da mesma.

Curitiba, 01 de abril de 2013.

Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez
Matrícula SUAPE 1280073
Coordenador Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia - BLUFPR


Ricardo Fernandez Perez
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

Centro Politécnico - Caixa Postal 19031 - CEP: 81531-960 - Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1714 - Fax (41) 3361-1714 - fisiolog.a@ufpr.br
www.bio.ufpr.br

AGRADECIMENTOS

À *Deus* pela vida.

Aos meus pais, *Wolni Meyer e Marli Barp Meyer*, pela criação, educação, amor, carinho e por toda a atenção e apoio durante minha vida, mas principalmente durante esta etapa. Obrigada, obrigada e obrigada Pai e Mãe!

À minha Orientadora, *Profª Drª Rosana Nogueira de Moraes*, minha Mãe no mundo científico. Por tudo que me ensinou, por me estimular e por acreditar em mim. “Quando crescer quero ser igual à você!”

Ao meu co-orientador, *Prof Dr Anderson Joel Martino Andrade*, por todo o auxílio prestado.

Ao meu noivo, *Renan Possa Rosa*, por todos os momentos de descontração que me proporcionou, fundamentais para descansar e relaxar. Obrigada pelo suporte que me deu durante os últimos momentos de dissertação. Suas palavras me acalmaram, me orientaram e me motivaram a continuar.

Às Doutoradas, cúmplices e amigas para a vida, com as quais tive o prazer de compartilhar momentos no laboratório e fora dele, que muito me ensinaram e ajudaram e com as quais este projeto foi realizado, *Graziela Müller e Katherine Maria Spencoski*. Sinto sua falta! Amo vocês!

Ao Sr. Médico Veterinário *Andrei de Souza Santos* o qual tive o prazer de conhecer melhor durante o Mestrado e que muito me auxiliou. Obrigada amigo!

Ao amigo, querido por todos, super ativo, criativo e curioso que com sua energia contaminante trouxe descontração e, ousou dizer, equilíbrio para o laboratório. *Evaldo Ribeiro Jr.*, você é demais! Obrigada por todas as conversas, conselhos e palavras de incentivo!

Ao *Dr. Budhan Pukazhenth*i, o qual também considero meu orientador. Por suas poucas palavras durante um congresso, mas que serviram de grande incentivo.

Ao *Projeto Focinhos*, pelo enorme auxílio encontrando os animais participantes deste estudo.

À *CAPES* pela bolsa concedida.

À todos que direta ou indiretamente participaram no desenvolvimento deste estudo.

Obrigada!

“Somos todos visitantes deste tempo, deste lugar. Estamos só de passagem. O nosso objetivo é observar, crescer e amar... Depois, vamos para casa.”

(Provérbio Aborígene)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a esteroidogênese e a espermatogênese em relação à qualidade espermática em machos de gatos domésticos de forma a responder questões sobre a sazonalidade reprodutiva e o fenômeno da teratospermia em felinos. Foram realizadas análises da morfologia e de parâmetros físicos de espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo, mensuração das concentrações sérica de testosterona (T) e intratesticulares de T e 17β -estradiol (E2) e análise da atividade do epitélio germinativo por citometria de fluxo. Devido ao achado prévio de que o desequilíbrio entre T e E2 poderia causar alterações na espermatogênese em gatos domésticos teratospérmicos ocasionais, buscou-se ainda validar o ensaio de atividade da enzima aromatase, enzima responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos, através do protocolo de incorporação de trício da molécula de 1β - ^3H -androstenediona (^3H -A) na $^3\text{H}_2\text{O}$. Para o primeiro estudo foram processadas amostras de 44 animais adultos (11 a 46 meses), pesando entre 3,0 e 6,2 kg e divididos em estação reprodutiva (ER; n=22) e não reprodutiva (ENR; n=22), conforme a data de coleta da amostra. Para a atividade da enzima aromatase (AA) foram utilizados extratos microssomais (n=8) e/ou homogenatos de testículos de gatos domésticos (n=8) e leitões (n=5) e ovários de ratas (n=6). Todos os gatos domésticos utilizados nos ensaios apresentavam qualidade espermática (morfologia, número total de espermatozóides, motilidade e vigor) semelhante àquela de gatos considerados normospérmicos. O percentual de células haploides, taxas de transformação total e meiótica, foram maiores durante a ER; já o percentual de células diploides foi maior durante a ENR. A concentração de T e a proporção T:E2 intratesticulares, assim como alguns defeitos espermáticos foram maiores durante a ER. Houve correlação entre a concentração de E2 intratesticular e o percentual de espermatozóides com acrossoma anormal ($r=0,47$). A AA foi detectada nos extratos microssomais de ovários de ratas, porém, não foi detectável em extratos microssomais de testículos de gatos domésticos. Já em homogenatos, a AA foi detectada em testículos de gatos domésticos ($0,52 \pm 0,07$ pmol/g/h), sendo esta mais baixa do que aquela mensurada em homogenatos de testículos de porcos ($213,7 \pm 7,1$ pmol/g/h) e de ovários de ratas ($219,3 \pm 11,2$ pmol/g/h). Incubações dos homogenatos com concentrações crescentes de inibidor de aromatase fadrazole resultaram em curva de inibição dose-resposta típica para ovário de rata e testículos de porcos, porém, em função dos valores muito baixos, a inibição nos homogenatos de testículo de gato doméstico foi de apenas 40%. Em conclusão, as amostras coletadas durante a ER apresentaram maior taxa de atividade espermatogênica, juntamente com maior proporção T:E2. Foi possível detectar a AA em homogenato de testículos de gatos domésticos, mas estes valores não correlacionaram com nenhuma das variáveis analisadas. Sugerimos que técnicas mais sensíveis deverão ser utilizadas para avaliar a síntese de estrogênios em testículos de gatos domésticos e sua relação com a atividade espermatogênica.

Palavras-chave: gatos domésticos, sazonalidade, esteroidogênese, aromatase, espermatogênese.

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate steroidogenic and spermatogenic activities in relation to sperm quality in domestic cats' males in order to answer questions about reproductive seasonality and the phenomenon of teratospermia in felines. There were proceeded analysis of morphology and physical parameters of sperms collected from the cauda epididymis, measurement of serum testosterone (T), testicular T and 17β -estradiol (E2) concentrations and analysis of seminiferous epithelium activity by flow cytometry. Because previous finds had shown a disbalance between T and E2 could cause alterations in spermatogenesis in occasional teratospermic domestic cats, we aimed to validate the aromatase activity assay, enzyme responsible for the conversion of androgens into estrogens, with the protocol of incorporation of tritium from the molecule of 1β - ^3H -androstenediona into $^3\text{H}_2\text{O}$. For the first study 44 samples of adult male cats (11 to 46 months), weighing between 3.0 and 6.2 kg were processed and divided into breeding (BS; n=2) and non-breeding season (NBS; n=22), based on the time of sample collection. For the measurement of aromatase activity (AA) there were utilized domestic cats (n=8) and piglets (n=5) testicles and rat ovaries (n=6) microsomes and/or homogenates. All the domestic cats used in this study presented spermatic quality (morphology, total sperm number, motility and progressive motility) similar to that found in normospermic cats. The percentage of haploid cells, total spermatogenic transformation and meiotic index were higher during the BS; however the percentage of diploid cells was higher during the NBS. Testicular T and E2 concentrations, as well as some spermatic defects were higher during BS. There was correlation between testicular E2 and the percentage of sperm with abnormal acrosome ($r = 0.47$). AA was detected in rat ovaries microsomal fraction, however was not detected in domestic cats testicles microsomal fraction. In homogenates the AA was detected in domestic cats testicles (0.52 ± 0.07 pMol/g/h), and was lower than that measured in piglets testicles (213.7 ± 7.1 pMol/g/h) and rat ovaries ($219,3 \pm 11,2$ pMol/g/h). Incubations of homogenates with increasing concentrations of the aromatase inhibitor fadrozole resulted in a typical inhibitory dose-response curve for rat ovaries and piglets testicles, however, because of the very low values, the inhibition of AA in domestic cats homogenates was only 40%. In conclusion, the samples collected during the BS presented higher spermatogenic activity, together with higher T:E2 ratio. It was possible to detect AA in domestic cats' testicles, but the values did not correlate with any of the variables analyzed. We suggest that more sensible techniques must be used to evaluate the strogens synthesis in domestic cat testicles and its relation with the spermatogenic activity.

Key-words: domestic cats, seasonality, steroidogenesis, aromatase, spermatogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução Geral

- FIGURA 1** - Esquema demonstrando a relação entre as células germinativas e as células de Sertoli em epitélio seminífero de testículo humano. Podem ser observadas as espermatogônias (SG), espermatócitos primários (SC), espermátides (SD), células de Sertoli (S) e gotas citoplasmáticas contendo lipídeos (L). A região especializada de junções entre as células de Sertoli é mostrada no quadro em destaque. Fonte: Kerr *et al.*, 2006.....18
- FIGURA 2** - Diagrama de fita mostrando a estrutura da enzima aromatase de placenta humana. As α -hélices estão marcadas de A a L e as folhas- β estão numeradas de 1 a 10. Pode-se visualizar o grupo heme e a molécula de androstenediona, colorida em magenta para representar a nuvem de elétrons, no sítio ativo da enzima aromatase. Fonte: Ghosh *et al.*, 2010.....22
- FIGURA 3** - Sequência de reações catalisadas pela enzima P450 aromatase com auxílio do NADPH redutase. A aromatase é responsável pela ligação ao substrato androgênico com 19 carbonos e modificação do anel "A" para o anel aromático (*) característico dos estrógenos com 18 carbonos. Da Reação 1 resulta um andrógeno C19-hidroxilado e da Reação 2, um andrógeno C19-aldeído, o qual é posteriormente oxidado (Reação 3) para formação do anel aromático. Substituindo o radical X por -O ou -H, tem-se as moléculas de androstenediona ou testosterona, as quais quando convertidas formam estrona ou 17 β -estradiol, respectivamente. Adaptado de Akhtar; Wright; Lee-Robichaud; 2011.....23
- FIGURA 4** - Total de espermatozóides normais, em percentagem, em 23 espécies (ou subespécies) da família Felidae. Valores dados em média \pm EPM. Os números entre parênteses indicam o número de animais avaliados. Fonte: Pukazhenthil *et al.*, 2006.....27

FIGURA 5 - Formas espermáticas encontradas em ejaculado de gato doméstico (*Felis silvestris catus*): a) gota citoplasmática proximal; b) gota citoplasmática distal; c) cabeça destacada (flecha aberta); defeito de acrossoma (flecha fechada) e gota citoplasmática proximal; d) defeito de acrossoma (flecha) e ambos os espermatozóides apresentam gota citoplasmática proximal; e) defeito de acrossoma, o espermatozoide da direita apresenta defeito de peça intermediária; f) defeito de peça intermediária; g) peça intermediária anormal; h) cauda dobrada com gota; i) peça intermediária dobrada com gota; j) cauda enrolada; k) cauda duplamente dobrada; l) espermatozoide normal. Fonte: Axné et al., 2007.....30

Artigo 1

FIGURE 1 - A) Percentages of haploid (1C), diploid (2C) and tetraploid (4C) cells; (B) total spermatogenic transformation (1C:2C), and meiotic index (1C:4C); as revealed by flow cytometry in testis of domestic cats during the breeding (BS; spring and summer) and non-breeding (NBS; autumn and winter) seasons. (* P<0.001).....45

Artigo 2

FIGURE 1 - Aromatase activity measured in ovarian microsomal protein (50 µg) obtained from rats at the estrous phase. Incubations were made with 30, 100 or 150 nM of 1β-³H-androstenedione (³H-A). Values are Mean ± SEM of triplicate incubations; superscript letters indicate differences between assays (p<0.001).....61

FIGURE 2 - Aromatase activity inhibition curve in homogenates of rat ovary (a), and piglet's (b) and domestic cat's (c) testes in the presence of increasing concentrations of the aromatase inhibitor Fadrozole. Values are Mean ± SEM of triplicate incubations. Note differences in the X axis scale among species.....62

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

- TABLE 1** - Age, body weight, testes mass and gonadosomatic index of domestic cats during the breeding (spring and summer) and non-breeding (autumn and winter) seasons (mean \pm SEM).....44
- TABLE 2** - Testicular testosterone and 17 β -estradiol, and serum testosterone concentrations in domestic cats during the breeding (spring and summer) and non-breeding (autumn and winter) seasons (mean \pm SEM).....45
- TABLE 3** - Sperm traits and incidence of morphologically normal and abnormal sperm from the cauda epididymis of domestic cats during the breeding (spring and summer) and non-breeding (autumn and winter) seasons (mean \pm SEM).....46

Artigo 2

- TABLE 1** - Sperm traits and incidence of morphologically normal and abnormal sperm from the cauda epididymis of domestic cats (n=8).....60
- TABLE 2** - Testicular testosterone and 17 β -estradiol concentrations and testicular T:E2 ratio in domestic cats (mean \pm SEM).....60
- TABLE 3** - Percentages of haploid (1C), diploid (2C) and tetraploid (4C) cells, total spermatogenic transformation (1C:2C) and meiotic index (1C:4C) as revealed by flow cytometry in the testis of domestic cats (n=8; mean \pm SEM).....60
- TABLE 4** - Aromatase activity recovered from incubations of testicular homogenates of domestic cats and piglets and ovary homogenates from rats, incubated

with 150 nM of 1β - ^3H -androstenedione (^3H -A) and different amounts of protein. Values are mean \pm SEM of triplicate incubations.....61

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Atividade da enzima aromatase
AMPc – Adenosina monofosfato cíclica
AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
BSA – Albumina sérica bovina
CRE – Elemento responsivo ao AMPc
DMSO – Dimetil sulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EIE – Enzimaimunoensaio
ENR – Estação não reprodutiva
ER – Estação reprodutiva
E2 – 17 β -estradiol
HRP – Horseradish peroxidase
³H-A – 1 β -³H-androstenediona
IGS – Índice gonadossomático
IM – Intramuscular
IME – índice de motilidade espermática
PBS – Solução tampão fosfato
PI – Iodeto de propídio
PKA – Proteína quinase A
T – Testosterona
TNF α – Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Espermatogênese e esteroidogênese intratesticular	16
1.1.1 Enzima Aromatase.....	21
1.3 Teratospermia em felinos	26
1.4 Efeitos sazonais sobre a qualidade espermática em gatos domésticos	31
1.5 Justificativas	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos específicos	35
3 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	36
 CAPÍTULO I - SEASONALITY IN MALE DOMESTIC CATS: TESTICULAR STEROIDOGENIC AND SPERMATOGENIC FUNCTION.....	37
Abstract	38
1 Introduction.....	39
2 Materials and methods	41
2.1 Chemicals	41
2.2 Animals and orchiectomy	41
2.3 Collection and analysis of epididymal sperm	42
2.4 Testicular testosterone and 17 β -estradiol measurements	42
2.5 Analysis of spermatogenesis by flow cytometry.....	43
2.6 Statistical analysis	43
3 Results	44
4 Discussion	47
5 Conclusion.....	50
6 Acknowledgments	50
 CAPÍTULO II – TESTICULAR AROMATASE ACTIVITY IN DOMESTIC CAT (<i>Felis catus</i>)	51
Abstract	52

1 Introduction.....	53
2 Materials and methods	55
2.1 Chemicals	55
2.2 Animals and orchietomy	55
2.3 Collection and analysis of epididymal sperm	55
2.4 Testicular testosterone and 17 β -estradiol measurements	56
2.5 Analysis of spermatogenesis by flow cytometry.....	57
2.6 Measurement of aromatase activity	57
2.7 Statistical analysis	59
3 Results	59
3.1 Aromatase activity assay validation in rat ovaries and piglet testes.....	61
3.2 Aromatase activity measured in microsomes and homogenates of domestic cat testicles.....	63
3.3 Correlations	63
4 Discussion	64
5 Acknowledgments	66
4 DISCUSSÃO GERAL	67
4.1 Função espermatogênica e esteroidogênica em gatos domésticos e sazonalidade.....	67
4.2 Atividade de aromatase em testículo de gato doméstico.....	71
5 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESPERMATOGÊNESE E ESTEROIDOGENESE INTRATESTICULAR

Os testículos são caracterizados por desempenhar duas principais funções: espermatogênese e síntese de hormônios esteroides (CARREAU; HESS, 2010). Essas funções são realizadas por diferentes tipos celulares: nos túbulos seminíferos são encontradas as células germinativas e as células de Sertoli, enquanto no espaço intersticial estão as células de Leydig (HESS *et al.*, 1995). Graças às suas características estruturais e funcionais, as células de Sertoli organizam os túbulos seminíferos em compartimentos distintos e são responsáveis pela manutenção e sustentação das células germinativas mediante conexões físicas, produção de hormônios, fatores reguladores e de nutrientes (GRISWOLD, 1995; DONNELL *et al.*, 2001).

A espermatogênese, sequência de eventos que resulta na formação de espermatozóides, ocorre dentro dos túbulos seminíferos de mamíferos durante toda a vida reprodutiva do animal, podendo ser interrompida temporariamente, em função de fatores ambientais (MORAIS, 2000; BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; SCHÖN; BLOTTNER, 2008) ou pode ocorrer uma onda espermatogênica única durante a vida do animal, como ocorre com o camundongo marsupial *Antechinus strudii* (KERR *et al.*, 2006). É um processo cíclico, altamente organizado e complexo, pelo qual as espermatogônias, células germinativas imaturas, desenvolvem-se, dando origem aos espermatozóides. Esse processo pode ser dividido em quatro fases principais: (1) renovação e proliferação das espermatogônias por meio de mitoses, (2) diferenciação das espermatogônias que entrarão no processo de (3) redução do número cromossômico por meiose dando origem aos espermatócitos, e (4) a transformação de uma célula convencional em uma estrutura complexa e diferenciada que são os espermatozóides; esta última fase representa um processo metamórfico denominado espermiogênese (SHARPE *et al.*, 1994) (FIGURA 1).

Durante a espermatogênese, diferentes associações celulares são formadas, denominadas de estágios, os quais são identificados conforme a alteração na forma do núcleo das espermatídes, a ocorrência de divisão meiótica e o

arranjo das espermatídes dentro do epitélio germinativo (DONNELL *et al.*, 2001). A identificação dos estágios do epitélio seminífero também pode ser feita levando-se em consideração o desenvolvimento do acrossoma e a morfologia das espermatídes (FRANÇA; GODINHO, 2003). A duração total da espermatogênese é espécie-específica e relativamente constante para cada espécie (DONNELL *et al.*, 2001). No gato doméstico (*Felis catus*) oito estágios ou associações celulares são identificados para o ciclo do epitélio germinativo. A duração total da espermatogênese é em média de 46,8 dias, tendo por base que a espermatogênese total é de 4,5 ciclos, com uma duração média de 10,4 dias para cada estágio (FRANÇA; GODINHO, 2003).

Os espermatozóides liberados na luz dos túbulos seminíferos são transportados até o epidídimo por meio da *rete testis* e ductos eferentes (ROBAIRE *et al.*, 2006). O epidídimo é um ducto único e extremamente enovelado que pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda, conforme a função desenvolvida em cada região (JONES; GLOVER, 1975; GLOVER *et al.*, 1971). O epitélio epididimário possui funções secretórias e absorptivas que criam um ambiente luminal específico para o processo de maturação espermática (ROBAIRE *et al.*, 2006). As alterações espermáticas relacionadas ao processo de maturação iniciam-se nas porções da cabeça e corpo do epidídimo e continuam ocorrendo conforme o trânsito dos espermatozóides através do trato reprodutor masculino e feminino até a interação e eventual fertilização do oócito (ROBAIRE *et al.*, 2006). Já a cauda do epidídimo é o local de armazenamento dos espermatozóides previamente à ejaculação (AXNÉR, 2006).

A coordenação de todos estes eventos obedece a um controle genético e hormonal altamente coordenado, os quais determinam a qualidade e quantidade de espermatozóides produzidos pelos testículos (SHARPE *et al.*, 1994; FRANÇA *et al.*, 1998; POINTIS *et al.*, 2005). O controle endócrino da espermatogênese no testículo dos mamíferos sofre ação coordenada principalmente das gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), secretados pela adeno-hipófise em resposta ao hormônio hipotalâmico GnRH. As células de Leydig são alvo do LH o qual estimula a secreção de esteroides, principalmente androgênios, os quais podem ser aromatizados em estrógenos. Testosterona e 17 β -estradiol exercem efeitos locais sobre a espermatogênese e também tem efeito de retroalimentação negativa sobre as células hipotalâmicas, controlando a secreção de

GnRH, e sobre as células adeno-hipofisárias limitando a secreção de LH e FSH. Já o alvo principal do FSH são as células de Sertoli e as células germinativas, onde atua estimulando a espermatogênese. Em resposta ao FSH as células de Sertoli também produzem o hormônio inibina, o qual faz retroalimentação negativa sobre a adeno-hipófise, suprimindo a secreção de FSH (DONNELL *et al.*, 2001; 2006).

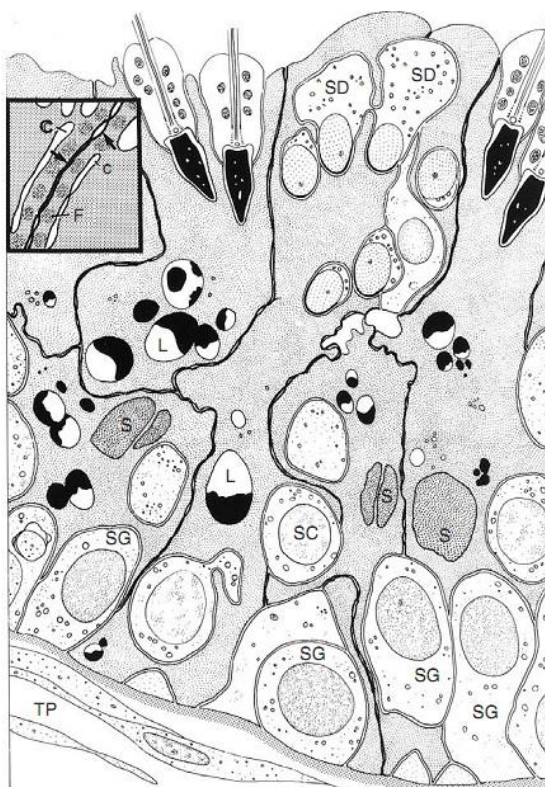


FIGURA 1. Esquema demonstrando a relação entre as células germinativas e as células de Sertoli em epitélio seminífero de testículo humano. Podem ser observadas as espermatogônias (SG), espermatócitos primários (SC), espermatídeos (SD), células de Sertoli (S) e gotas citoplasmáticas contendo lipídeos (L). A região especializada de junções entre as células de Sertoli é mostrada no quadro em destaque. Fonte: Kerr *et al.*, 2006.

Os processos de espermatogênese e maturação espermática no epidídimo dependem de um controle preciso do ambiente endócrino no trato reprodutivo, decorrente de uma interação sincronizada do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, resultando em níveis adequados dos vários hormônios reprodutivos, bem como no controle da expressão de seus receptores nas células-alvo (SHARPE, 1994; FRANÇA *et al.*, 1998; POINTIS *et al.*, 2005). A espermatogênese, embora seja

dependente da ação de FSH e da testosterona sobre a célula de Sertoli (D'SOUZA *et al.*, 2005), também é influenciada pelo equilíbrio entre andrógenos e estrógenos no trato reprodutor masculino (CARREAU *et al.*, 2003).

A testosterona, juntamente com os demais hormônios androgênicos, é essencial para a diferenciação sexual, manutenção da função dos órgãos sexuais acessórios e das características sexuais secundárias e, ainda, para o início, manutenção e retomada da espermatogênese (CARREAU, 2001; CARREAU *et al.*, 2002; RISBRIDGER; TAYLOR, 2006). A concentração de testosterona no fluido da *rete testis* dos túbulos seminíferos do homem e de roedores é de 50 a 100 vezes maior do que aquela encontrada na circulação (CHENG *et al.*, 2010), a qual é aparentemente necessária para manter o desenvolvimento das células germinativas e a fisiologia normal das células de Sertoli no epitélio germinativo (DONNELL *et al.*, 2001). Em gatos domésticos a concentração sérica de testosterona pode variar desde 0,02 ng/mL até 18,2 ng/mL em animais adultos (JOHNSTONE *et al.*, 1984; HOWARD *et al.*, 1990; TSUTSUI *et al.*, 2009; MÜLLER *et al.*, 2012), enquanto a concentração intratesticular varia de 823 ng/g até 1.239 ng/g de testículo (NEUBAUER *et al.*, 2004; MÜLLER *et al.*, 2012).

Os estrógenos foram considerados por muito tempo hormônios específicos ou com maior importância para os indivíduos do sexo feminino, embora a presença de estrógenos na gônada masculina esteja bem caracterizada há mais de 70 anos (ZONDEK, 1934; *apud* CARREAU *et al.*, 2009), quando foi confirmada a presença de estrógenos em urina de garanhões. Porém, evidências de que a gônada masculina é capaz de sintetizar e secretar estrógenos surgiram apenas 30 anos depois (CARREAU; HESS, 2010). O aumento de interesse sobre os efeitos destes hormônios no trato reprodutor masculino ocorreu desde quando foi demonstrado que camundongos “knock-out” para o receptor α de estrógenos (LUBAHN *et al.*, 1993), ou para a enzima aromatase (ROBERTSON *et al.*, 1999) apresentam comprometimento na fertilidade. Outro importante fator foi o achado da diminuição na contagem total de espermatozóides em homens devido a exposição a estrógenos presentes no ambiente (SHARPE; SKAKKEBAEK, 1993; SKAKKEBAEK, 2004), embora existam controvérsias (HANDELSMAN, 2000).

Os estrógenos exercem seus efeitos biológicos através da interação com os receptores de estrógenos intracelulares de dois tipos α ou β , os quais podem modular a transcrição de genes alvo ou fazer um rápido efeito transmembrana

ativando e recrutando cofatores (CARREAU *et al.*, 2011). Receptores de estrógenos do tipo α e β são expressos no trato reprodutor masculino de várias espécies, incluindo camundongos (COUSE; KORACH, 1999), ratos (FISHER, 1997), cães e gatos (NIE *et al.*, 2002) e no homem (CARREAU *et al.*, 2011), porém ainda existem controvérsias em relação à localização e tipo de receptor presente em cada célula. O único ponto de concordância é a ampla distribuição do receptor do tipo β no trato reprodutor masculino (DONNELL *et al.*, 2001; CARREAU *et al.*, 2010), entretanto camundongos “knock-out” para este receptor não apresentaram alterações na espermatogênese (COUSE, 1997). Já camundongos “knock-out” para receptor de estrógenos do tipo α são inférteis devido a pressão que o fluido seminal exerce sobre o parênquima testicular, resultado da não absorção do conteúdo seminal nos ductos eferentes (ZHOU *et al.*, 2001).

Em machos de gatos domésticos foi detectada a presença de receptores para estrógenos do tipo α na cabeça do epidídimo e nos ductos eferentes (SCHÖN *et al.*, 2009) e, sabe-se que é nesta região onde a concentração espermática é aumentada, indicando que um processo de absorção de conteúdos ocorre de forma a concentrar as células espermáticas (AXNÉR, 1999 e 2006). Desta forma, defeitos espermáticos, tais como caudas dobradas, com persistência da gota citoplasmática, podem ser decorrentes da falha na regulação isovolumétrica dos espermatozóides, quando maturados em condições epididimárias adversas (AXNÉR, 2006).

A exposição pré-natal a altas concentrações de estrógenos ou desreguladores endócrinos, com ação estrogênica ou anti-androgênica, induzem desordens no trato reprodutor masculino, tais como câncer de testículo, espermatogênese anormal e criptorquidismo (TOPPARI *et al.*, 1996; SHARPE, 2003; SKAKKEBAEK, 2004). Homens que apresentaram mutação natural no gene da aromatase, resultando em uma enzima inativa, desenvolveram alterações dos níveis de estrogênio e/ou de seus receptores acarretando em anormalidades testiculares e seminais, tais como criptorquidismo, menor produção espermática e perfil endócrino alterado (JONES *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 1994); e à modificações significativas nas características do epitélio germinativo bem como na composição do fluido epididimário (FISHER *et al.*, 1998).

A concentração sérica de estrogênios em machos de mamíferos é muito baixa e varia de 2 a 180 pg/mL, de acordo com a espécie, sendo excepcionalmente alta nos machos equinos, com concentração de até 2.447 pg/mL. A concentração de

estrogênios são tipicamente maiores nos tecidos do trato reprodutor masculino e sua concentração varia de 11,5 pg/mL na *rete testis* do touro até 4.116 pg/mL no sêmen de cavalos (HESS, 2000). Para gatos domésticos (MÜLLER *et al.*, 2012) encontrou a concentração média de 17 β -estradiol no soro de $10,4 \pm 1,7$ pg/mL e no testículo de 7 ± 2 ng/g de testículo.

1.1.1 Enzima Aromatase

A enzima aromatase é um complexo enzimático formado pelas proteínas citocromo P450 aromatase (FIGURA 2) e NADPH-redutase, presentes no retículo endoplasmático das células onde o complexo enzimático é expresso. A aromatase é responsável por converter, de forma irreversível, andrógenos em estrógenos (AKHTAR; WRIGHT; LEE-ROBICHAUD, 2011; CARREAU; WOLCZYNSKI; GALERAUD-DENIS, 2010; SIMPSON *et al.*, 2002). Na maioria das espécies estudadas até agora (i.e. cabra, ovelha, cavalo, vaca, macaco, homem, camundongo, rato e coelho) a P450 aromatase é derivada de um único gene denominado CYP19 (CONLEY, 2001; SIMPSON *et al.*, 2002) e a sequência de aminoácidos que a compõe é bem conservada dentre os vertebrados (WILSON; MCARTHUR; STEGEMAN, 2005). A espécie suína é a única exceção até agora encontrada, pois possui três genes que expressam três isoformas distintas da aromatase em diferentes tecidos (placenta, gônadas e embrião) (CONLEY *et al.*, 1996, 1994; CORBIN; KHALIL; CONLEY, 1995). No homem, este gene apresenta mais de 120 kb de comprimento, dentre os quais apenas 30 kb representam a região decodificadora da enzima, sendo o restante composto por regiões regulatórias, contendo 10 tipos de promotores utilizados no controle da expressão nos diferentes tipos de tecidos que expressam a aromatase (BULUN *et al.*, 2003; CARREAU; WOLCZYNSKI; GALERAUD-DENIS, 2010; DONNELL *et al.*, 2001).

Os substratos androgênicos são ligados ao sítio ativo da enzima aromatase (FIGURA 2) aonde são catalisados por uma série de reações, resultando na formação do anel aromático característico dos esteroides estrogênicos (AKHTAR; WRIGHT; LEE-ROBICHAUD, 2011; SIMPSON; MAHENDROO, 1994).



FIGURA 2. Diagrama de fita mostrando a estrutura da enzima aromatase de placenta humana. As α -hélices estão marcadas de A a L e as folhas- β estão numeradas de 1 a 10. Pode-se visualizar o grupo heme e a molécula de androstenediona, colorida em magenta para representar a nuvem de elétrons, no sítio ativo da enzima aromatase. Fonte: Ghosh *et al.*, 2010.

O substrato pelo qual a enzima aromatase apresenta maior afinidade é a androstenediona, a qual é convertida em estrona, entretanto a testosterona e a 16α -hidroxiandrostenediona também podem ser convertidos em 17β -estradiol e estriol, respectivamente. Para cada mol de substrato convertido são utilizados 3 mol de O_2 e 3 mol de NADPH (REED; OHNO, 1976; SIMPSON; MAHENDROO, 1994; SIMPSON *et al.*, 2002; THOMPSON; SIITERI, 1974). As moléculas de oxigênio são utilizadas para oxidar o grupo metil presente no carbono 19 resultando na formação de ácido fórmico, o que ocorre concomitantemente com a aromatização do anel fenólico presente no produto estrogênico e, ainda, como subproduto da reação é gerada uma molécula de água (FIGURA 3). O NADPH-redutase é responsável por suprir os equivalentes redutores para as reações, sendo esta função exercida com qualquer citocromo P450 com o qual venha a entrar em contato (GUENGERICH; SOHL; CHOWDHURY, 2011; SIMPSON *et al.*, 2002).

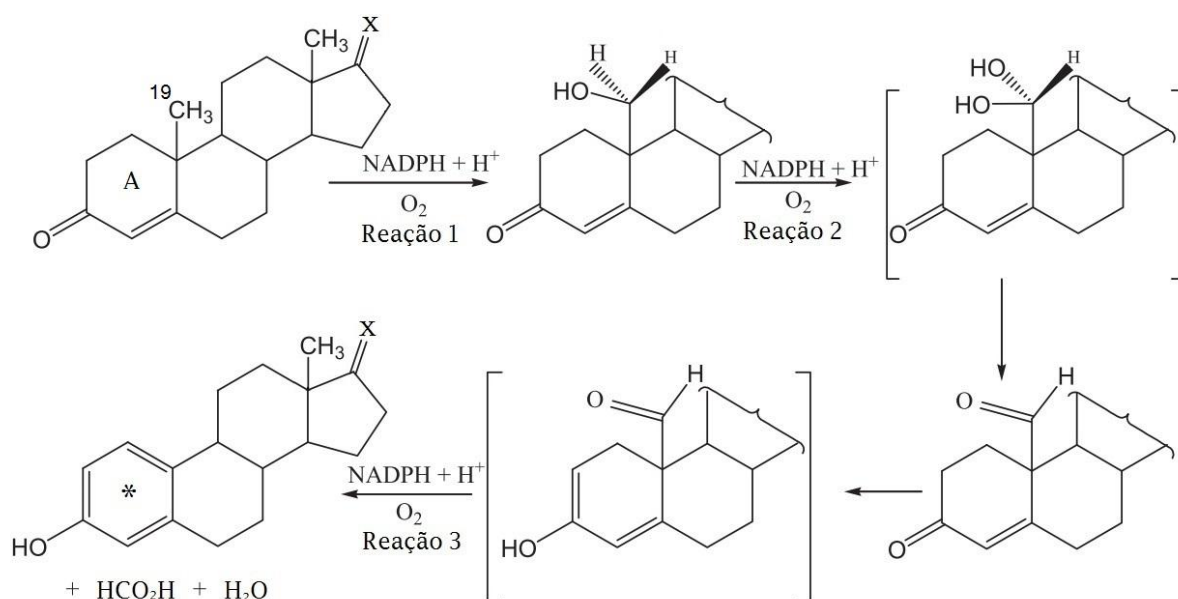


FIGURA 3. Sequência de reações catalisadas pela enzima P450 aromatase com auxílio do NADPH redutase. A aromatase é responsável pela ligação ao substrato androgênico com 19 carbonos e modificação do anel "A" para o anel aromático (*) característico dos estrógenos com 18 carbonos. Da Reação 1 resulta um andrógeno C19-hidroxilado e da Reação 2, um andrógeno C19-aldeído, o qual é posteriormente oxidado (Reação 3) para formação do anel aromático. Substituindo o radical X por -O ou -H, tem-se as moléculas de androstenediona ou testosterona, as quais quando convertidas formam estrona ou 17 β -estradiol, respectivamente. Adaptado de Akhtar; Wright; Lee-Robichaud; 2011.

Para a maioria dos vertebrados a expressão da enzima aromatase está restrita às gônadas e ao cérebro, como é o caso de algumas espécies de peixes, aves e roedores. Já em primatas vários tecidos extragonadaes, tais como placenta, tecidos fetais, tecido adiposo, pele, ossos e musculatura lisa dos vasos sanguíneos também expressam o gene CYP19 (SIMPSON *et al.*, 1994; CARREAU; WOLCZYNSKI; GALERAUD-DENIS; 2010). A placenta também já foi identificada como um sítio de produção de estrógenos em algumas espécies de ungulados, tais como vacas, ovelhas (VANSELOW *et al.*, 2001), porcas (CORBIN; KHALIL; CONLEY, 1995) e éguas (ARAI *et al.*, 2006), porém a biosíntese de estrógenos pelo tecido adiposo não foi identificada em bovinos, ratos, camundongos e coelhos (SIMPSON *et al.*, 1994).

A expressão do gene CYP19 é regulada por meio de diferentes sinais estimulatórios e promotores específicos em cada tecido. Por exemplo, nos folículos pré-ovulatórios e no corpo lúteo de ovários humanos a expressão da P450arom é

primeiramente estimulada pelo FSH causando aumento do AMPc intracelular e ativação da proteína quinase A (PKA) (MICHAEL; MICHAEL; SIMPSON, 1997; SIMPSON *et al.*, 2002). A PKA fosforila o elemento responsivo ao AMPc (CRE), o qual se liga à sua região no promotor do tipo II da sequência de DNA e recruta os demais coativadores para então ter início a transcrição (MICHAEL; MICHAEL; SIMPSON, 1997). No tecido adiposo humano, a expressão é estimulada pela classe I de citocinas, prostaglandinas, TNF α e glicocorticóides via promotores do tipo I.4, II e I.3 (HARADA; UTSUMI; TAKAGI, 1993; ZHAO; MENDELSON; SIMPSON; 1995). Já na placenta humana, o promotor I.1 é o condutor da expressão da aromatase e muitos grupos de pesquisa estudam as proteínas que interagem com esta sequência para regular a expressão em células de coriocarcinomas (SIMPSON *et al.*, 2002).

Os estrógenos exercem um importante papel na fisiologia óssea de homens e mulheres, especialmente na manutenção do nível de mineralização (CARANI *et al.*, 1997; MERLOTTI *et al.*, 2011). Alguns estudos indicam uma correlação positiva entre a expressão da P450arom em condições fisiológicas ou patológicas com a estimulação da osteogênese (NAWATA *et al.*, 1995; SHOZU; SIMPSON, 1998) e fatores tais como, 1,25-dihidroxicolecalciferol, IL-1 β , citocinas do tipo I, assim como TNF- α parecem estimular a expressão na presença de glicocorticoides (LEA *et al.*, 1997).

As células que compõe o câncer de mama tem a expressão da aromatase aumentada em até 3 ou 4 vezes daquela encontrada em uma célula com características normais, sendo esta diferença associada aos tipos de promotores ativados durante o processo de transcrição gênica (CHEN *et al.*, 2009; HARADA, 1997). A consequente superprodução local de estrógenos acaba por promover o crescimento e progressão das células cancerígenas na mama. Por isso, diversos centros de pesquisa buscam por uma molécula inibidora da atividade da enzima aromatase específico para este tecido-alvo, que promova menos efeitos colaterais do que aquelas até agora desenvolvidas e estudadas (CHEN *et al.*, 2009; CORRE *et al.*, 2005; JOHN-BAPTISTE *et al.*, 2013; VAN MEEUWEN *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2013).

Em mamíferos, a enzima aromatase (transcritos, proteína e atividade enzimática) já foi localizada em todas as células testiculares, inclusive, em espermatozóides ejaculado de homens (AQUILA *et al.*, 2002; CARREAU *et al.*, 2009; CARREAU *et al.*, 2010) e exceto nas células mióides peritubulares

(CARREAU *et al.*, 2011). A expressão do gene CYP19 nas células testiculares está sob controle dos promotores do tipo II em homens e do tipo I.f e I.tr em ratos (LAMBARD *et al.*, 2005; SILANDRE, *et al.*, 2007; CARREAU; VIENNE; GALERAUD-DENIS, 2008; CARREAU; DELALANDE; GALERAUD-DENIS, 2008). Porém, ainda não se tem muitas informações sobre fatores que estimulam ou inibem a sua expressão pelas células testiculares.

No trato reprodutor masculino um controle preciso da expressão e atividade da aromatase deve ser exercido para evitar o desequilíbrio entre andrógenos e estrógenos, já que este desequilíbrio hormonal pode estar relacionado com o desenvolvimento de seminomas no homem (BOUSKINE *et al.*, 2008; ROGER *et al.*, 2005) e câncer testicular originado pela replicação descontrolada das espermatogônias, como ocorre em camundongos com aumento da expressão da enzima aromatase (LI; RAHMAN, 2008). Por outro lado, camundongos “knock-out” para esta enzima apresentam inicialmente fenótipo e espermatogênese normais, porém com a idade ocorre degeneração testicular (ROBERTSON *et al.*, 1999). Após 12 ou 14 semanas de idade um declínio significativo no número de espermátócitos e espermátides pode ser observado em camundongos alimentados com ração livre de fito estrógenos (ROBERTSON, 2002), mostrando a importância dos estrógenos na manutenção da espermatogênese, sendo este o melhor efeito direto já demonstrado dos estrogênios sobre o epitélio seminífero (CARREAU; HESS, 2010). Também foi observado que homens com deficiência de aromatase apresentam baixa motilidade espermática (ROCHIRA *et al.*, 2005), fato em comum com o modelo de camundongo “knock-out” (ROBERTSON *et al.*, 1999) e com dados demonstrados por Carreau e colaboradores (2009) e por Lazaros e colaboradores (2011), demonstrando o envolvimento da aromatase com a aquisição de motilidade espermática.

A atividade da enzima aromatase foi mensurada em vários tecidos sadios, incluindo ovário de rata ($166,6 \pm 54,4$ pmol/g/h; ODUM; ASHBY, 2002), cérebro de peixe (*Rutilus rutilus*; $2.400 \pm 595,2$ pmol/g/h; GERAUDIE *et al.*, 2011), testículos de porcos ($26,3 \pm 4,7 \times 10^6$ pmol/g/h; MORAN *et al.*, 2002) e humanos ($49,7 \pm 28,9$ pmol/g/h; LARDONE *et al.*, 2010), dentre outros.

1.3 TERATOSPERMIA EM FELINOS

Há mais de 30 anos tem-se estudado o fenômeno da teratospermia na família Felidae, característica esta prevalente nas 37 espécies que a compõe (FIGURA 2). A teratospermia é a condição em que mais de 60% dos espermatozóides ejaculados são morfologicamente anormais e as causas determinantes desta condição ainda são discutidas (PUKAZHENTHI; WILDT; HOWARD, 2001; PUKAZHENTHI *et al.*, 2006). A redução da variabilidade genética é um fator importante para o desenvolvimento de alterações na espermatogênese. Como demonstrado por Wildt *et al.* (1987) grupos de guepardo (*Acynonix jubatus*) que apresentavam baixa variabilidade genética produziram mais espermatozóides morfologicamente anormais do que indivíduos da mesma espécie provenientes de populações com maior variabilidade genética. O mesmo ocorre para o leão Asiático (*Panthera leo persica*) e para a puma da Flórida (*Puma concolor coryi*), os quais apresentam de 70 a 90% de formas anormais no ejaculado (ROELKE *et al.*, 1993; WILDT *et al.*, 1983). Gatos com pedigree, ou seja, gatos que apresentam uma raça definida e que foram selecionados para características diversas que não a qualidade espermática, apresentam maior percentual de espermatozóides anormais quando comparados com àqueles sem raça definida (AXNÉR; FORSBERG, 2007), o que poderia estar relacionado com a variabilidade genética. Porém, mesmo em populações onde a consanguinidade é considerada baixa, como nos pequenos felinos sul americanos, por exemplo, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato-domato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), alguns indivíduos produzem consistentemente ejaculados de baixa qualidade sugerindo que fatores nutricionais e de estresse, associados à condições subótimas de manejo em cativeiro (EIZIRIK *et al.*, 1998; MORAIS, 2000; MORAIS *et al.*, 2002; SWANSON *et al.*, 2003) podem estar envolvidos. Qualquer que seja a origem, esta condição é importante no que se refere ao impacto sobre a fertilidade destes indivíduos (MORAIS, 2000; PUKAZHENTHI *et al.*, 2006).

A teratospermia pode ocorrer esporadicamente no gato doméstico, sendo caracterizada por uma alta produção de formas anormais devido a fatores sazonais, abstinência sexual, nutrição ou ao estado de saúde do animal (MORAIS, 2000;

BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; JEWGENOW *et al.*, 2009). Nestes animais, normalmente há baixa contagem de espermatozoides, em contraste com o que ocorre naqueles indivíduos com teratospermia persistente (MORAIS *et al.*, 2002; NEUBAUER *et al.*, 2004). A hiper-atividade do epitélio germinativo em animais teratospérmicos é conseguida por meio de um aumento na massa de tecido testicular, maior número de células germinativas por célula de Sertoli e redução na perda de células germinativas por apoptose durante a espermatogênese (FRANÇA; GODINHO, 2003; NEUBAUER *et al.*, 2004; JEWGENOW *et al.*, 2009).

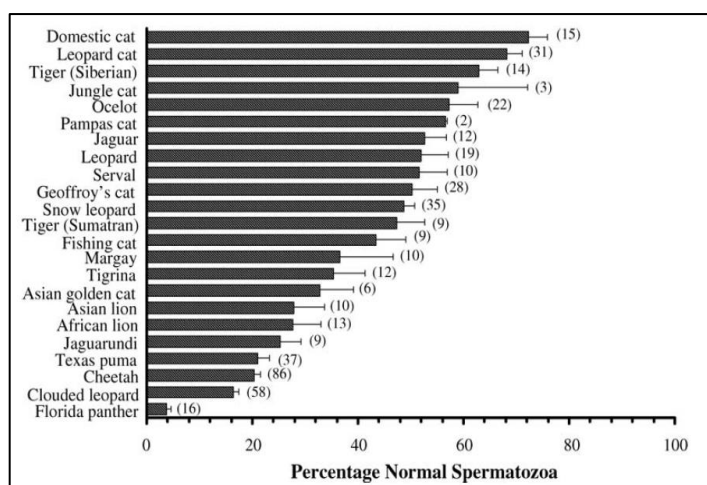


FIGURA 4. Total de espermatozoides normais, em percentagem, em 23 espécies (ou subespécies) da família Felidae. Valores dados em média \pm EPM. Os números entre parênteses indicam o número de animais avaliados. Fonte: Pukazhenthi, *et al.* (2006).

Em um estudo retrospectivo de 48 machos de gatos domésticos que tiveram seu sêmen coletado por eletroejaculação e analisado para morfologia, houve um percentual médio de 44% de espermatozoides normais. Dentre os animais somente 29% (14) apresentaram >60% de espermatozoides normais enquanto que 40% (19) apresentaram <40% de espermatozoides normais (AXNÉR; FORSBERG, 2007). De qualquer forma, estes dados demonstram que não é incomum que esta espécie apresente baixa percentagem de espermatozoides normais, como os felinos selvagens (MORAIS *et al.*, 2002; SWANSON, *et al.*, 2003; WILDT, *et al.*, 1987).

Mesmo gatos que são teratospérmicos podem ser férteis e produzir ninhadas (AXNÉR; FORSBERG, 2007). O mesmo ocorre com o guepardo (*A. jubatus*), o qual produz consistentemente ejaculados com baixa percentual de

espermatozóides normais, porém não apresenta comprometimento de fertilidade (LINDBURG *et al.*, 1993; MEROLA, 1994). O comportamento de acasalamento dos felinos com repetidas montas e ovulação induzida devem compensar o fato do baixo percentual de formas normais (AXNÉR; FORSBERG, 2007). Porém, animais com problemas de fertilidade além do alto percentual de defeitos espermáticos também apresentam um número baixo de espermatozóides normais (AXNÉR; FORSBERG, 2007).

Os níveis de testosterona sérica são normalmente mais baixos em felinos teratospérmicos, quando comparados com normospérmicos (HOWARD *et al.*, 1990). O mesmo acontece com os guepardos (*A. jubatus*) espécie que historicamente produz sêmen com alto percentual de espermatozóides anormais (65 – 76%) e tem concentração de testosterona sérica em torno de 0,3 – 0,5 ng/mL (WILDT, *et al.*, 1987, 1988), concentração similar aquela encontrada nos gatos domésticos teratospérmicos (HOWARD *et al.*, 1990). Porém, essa diferença não foi encontrada entre indivíduos com amostras teratospérmicas ocasionais (MÜLLER *et al.*, 2012), embora tenha sido encontrada uma tendência a menor concentração de testosterona intratesticular nos animais teratospérmicos ocasionais e persistentes (NEUBAUER *et al.*, 2004; MÜLLER *et al.*, 2012).

A concentração intratesticular de hormônios androgênicos e estrogênicos, assim como a proporção entre estes mesmos hormônios no testículo, podem estar relacionados com a produção de formas espermáticas anormais. No homem foi observado que a razão estradiol/testosterona no sangue periférico, na veia espermática e no plasma seminal de homens azoospérmicos é maior do que aquele encontrado em homens normozoospérmicos (PASQUIER *et al.*, 2008). No entanto, a atividade da enzima aromatase não foi diferenciada em testículos de homens que apresentavam diversas anomalias no tecido testicular que comprometiam a espermatogênese (LARDONE *et al.*, 2010), mas observaram correlação positiva entre o número de células de Sertoli e o nível de atividade enzimática. No gato doméstico, Müller e colaboradores (2012) encontraram a razão testosterona:estradiol diminuída em amostras espermáticas teratospérmicas ocasionais, quando comparadas com as normospérmicas, mas ainda não foi descrito valor de atividade de aromatase intratesticular para esta espécie. Além disso, o exato mecanismo pelo qual os estrógenos regulam a função do epitélio seminífero não foi completamente elucidado (CARREAU; HESS, 2010).

Uma das funções mais gerais dos estrógenos está sobre o controle da apoptose celular, regulando positiva ou negativamente (ROGER *et al.*, 2005; BOUSKINE *et al.*, 2008; LEWIS; JORDAN, 2009). Neubauer *et al.* (2004) concluíram que a alta produção de espermatozóides encontrada em animais teratospérmicos é alcançada com a perda da qualidade espermática associada com uma sobrecarga das células de Sertoli. Embora o número de células de Sertoli seja menor nos animais teratospérmicos, a razão espermátide:célula de Sertoli é duas vezes maior do que nos animais normospérmicos. O mesmo foi encontrado por Jewgenow *et al.* (2013), que concluíram a existência de duas formas de teratospermia em gato doméstico com base na morfologia espermática e no nível de atividade do epitélio germinativo. Os animais teratospérmicos permanentes apresentam alto percentual de defeitos espermáticos e relação espermátide/célula de Sertoli alto (~13 espermátides/célula de Sertoli), enquanto os teratospérmicos ocasionais podem apresentar percentuais elevados de defeitos espermáticos, porém apresentam esta relação em níveis considerados normais (~6 espermátides/célula de Sertoli).

Os defeitos espermáticos mais comumente encontrados em ejaculado de gatos domésticos são peça intermediária e cauda dobradas com gotas citoplasmáticas, mas nos teratospérmicos estas formas anormais aparecem duas vezes mais, além de uma variedade de deformidades de cabeça (microcefálico, macrocefálico, acrossoma anormal) e cauda fortemente enrolada (HOWARD *et al.*, 1990; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000, 2006; MORAIS *et al.*, 2002; NEUBAUER *et al.*, 2004; AXNÉR; FORSBERG, 2007; FAVRE *et al.*, 2012; MÜLLER *et al.*, 2012) (FIGURA 3). A presença de gotas citoplasmáticas é um achado comum em espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de muitas espécies (COOPER; YEUNG, 2003), mas a sua persistência pode estar associada com o desenvolvimento de dobras flagelares, alterando a sua motilidade e, logo, a capacidade de fertilizar um ovócito (COOPER, 2011). A remoção e fagocitose do citoplasma das espermátides ocorre durante o processo de espermição junto às células de Sertoli (COOPER; YEUNG, 2003; KERR *et al.*, 2006), porém em animais teratospérmicos e devido a sobrecarga nas células de Sertoli, pode ser que este processo esteja comprometido (JEWGENOW, *et al.*, 2009). Ainda, a menor proporção testosterona/estradiol intratesticular encontrada para gatos domésticos teratospérmicos ocasionais (MÜLLER *et al.*, 2012), pode estar associada com a redução da apoptose celular e mal funcionamento das células de Sertoli, resultando

em maiores percentuais de espermatozoides defeituosos. Entretanto, a incidência de tipos específicos de malformações espermáticas parece ser espécie-específica. O guepardo (*A. jubatus*), o leopardo (*Panthera japonensis*) e a puma (*Puma concolor*) apresentam como principais defeitos no ejaculado a cauda enrolada e a peça intermediária dobrada, enquanto leões (*Panthera leo*) apresentam alta incidência de gota citoplasmática ou cauda dobrada (WILDT *et al.*, 1983, 1987, 1988).

Os defeitos espermáticos encontrados em amostras ejaculadas em gatos domésticos são comparáveis àqueles encontrados em espermatozoides coletados diretamente do epidídimo (NEUBAUER *et al.*, 2004). Logo, a recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo é um procedimento válido para comparações e estudos de spermatologia.

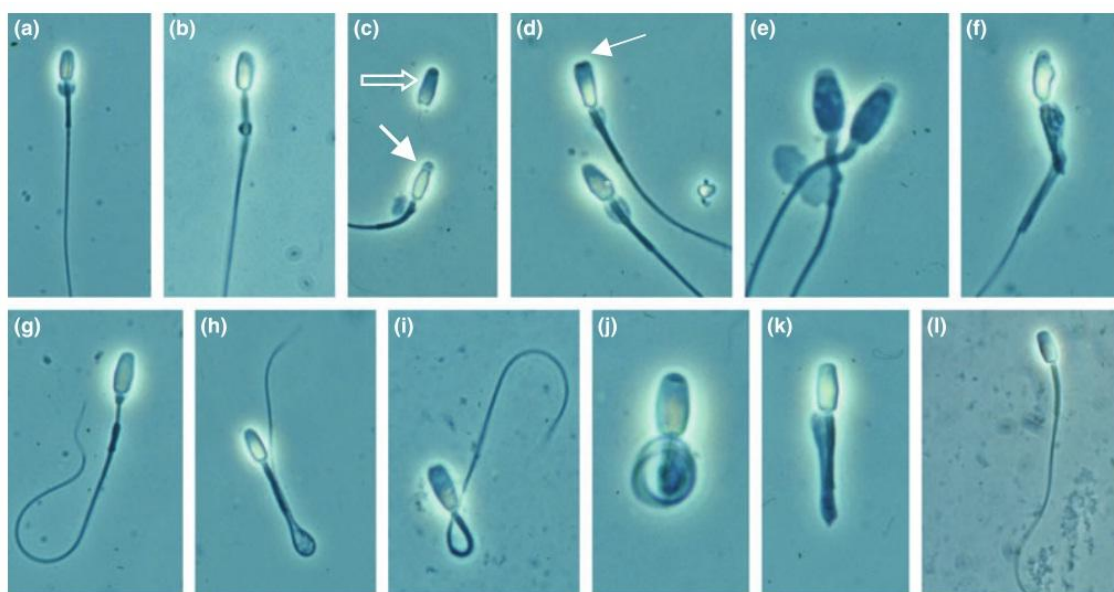


FIGURA 5. Formas espermáticas encontradas em ejaculado de gato doméstico (*Felis catus*): a) gota citoplasmática proximal; b) gota citoplasmática distal; c) cabeça destacada (flecha aberta); defeito de acrossoma (flecha fechada) e gota citoplasmática proximal; d) defeito de acrossoma (flecha) e ambos os espermatozoides apresentam gota citoplasmática proximal; e) defeito de acrossoma, o espermatozoide da direita apresenta defeito de peça intermediária; f) defeito de peça intermediária; g) peça intermediária anormal; h) cauda dobrada com gota; i) peça intermediária dobrada com gota; j) cauda enrolada; k) cauda duplamente dobrada; l) espermatozoide normal. Fonte: Axné *et al.*, 2007.

1.4 EFEITOS SAZONAIS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA EM GATOS DOMÉSTICOS

A sazonalidade na reprodução é comum entre os mamíferos como forma de adaptação às mudanças climáticas ambientais. O mecanismo adaptativo mais amplamente encontrado é a restrição da atividade reprodutiva para os momentos do ano em que coincidem os estágios de maior consumo energético (i.e., prenhez, nascimento, lactação e desmame dos filhotes) com os momentos de maior disponibilidade de alimento (BRONSON, 1985).

O foto período altera a secreção de melatonina na glândula pineal (ERICKSON; DANFORTH, 1995) e este hormônio é o principal sincronizador dos ciclos reprodutivos, alterando a secreção de GnRH no hipotálamo o que afeta a secreção dos hormônios gonadotróficos e, logo as funções gonadais (MALPAUX, 2006).

A sazonalidade na função testicular em algumas espécies pode variar desde ciclos de alta atividade espermatogênica até a sua completa interrupção, enquanto em outras ocorrem apenas variações moderadas de produção espermática durante o ano, como é o caso do gato doméstico (AXNÉR; FORSBERG, 2007; SPINDLER; WILDT, 1999; BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; NUÑEZ-FAVRE *et al.*, 2012; STORNELLI *et al.*, 2009; TSUTSUI *et al.*, 2009). Variações anuais da atividade ovariana e testicular foram estudadas em alguns felinos selvagens, incluindo o tigre (*Panthera tigris*; BYERS *et al.*, 1990) e o leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*; WILDT *et al.*, 1986) para os quais não foram encontradas alterações, mas para o leopardo das neves (*Uncia uncia*; JOHNSTON *et al.*, 1994) e o gato de Pallas (*Otocolobus manul*; NEWELL-FUGATE *et al.*, 2007), existe estação reprodutiva definida, pois são espécies cujo habitat apresenta variação climática extrema. Porém, estes estudos estavam voltados a examinar a ciclicidade reprodutiva, mais do que as variações na qualidade dos gametas produzidos.

No gato doméstico a produção espermática parece não ser afetada pelas estações, conforme Spindler e Wildt (1999). Espermatozóides coletados da cauda do epidídimo foram avaliados quantitativa e qualitativamente, e nenhuma variação foi encontrada entre os parâmetro avaliados. Entretanto, a maior parte dos nascimentos de filhotes ocorrem durante a primavera e o verão (ROBINSON; COX,

1970), fato este devido às fêmeas serem poliétricas sazonais, com período de anestro. Em gatos ferais, os machos adultos não mostraram variação mensal para o peso testicular ou para o percentual de túbulos seminíferos contendo espermátides ou espermatozóides, mas houve alterações no peso dos epidídimos, mostrando uma pequena influência sazonal (JONES; COMAN, 1982). Entretanto, o peso testicular mostrou características sazonais e uma alta correlação com a concentração de testosterona sérica, em uma população de gatos de área urbana (KIRKPATRICK, 1985).

A espermatogênese ocorre consistentemente ao longo do ano porque não existe, em princípio, um gasto energético tão elevado para o macho de gato doméstico assim como há para a fêmea na reprodução (BRONSON, 1985). A energia investida pelo macho para a reprodução termina com a cópula e é mínima quando comparada àquela despendida pela fêmea. Além disso, é geneticamente vantajoso para o macho ser reprodutivamente ativo por todo o ano, pois as chances de reprodução são aumentadas (SPINDLER; WILDT, 1999).

Entretanto, estudos recentes, sugerem que a qualidade e mesmo a produção espermática tem um caráter sazonal em gatos domésticos (AXNÉR; FORSBERG, 2007; BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; STORNELLI *et al.*, 2009; NUÑEZ-FAVRE *et al.*, 2012). Estes estudos demonstram uma tendência a maior concentração de testosterona sérica no período de primavera, quando o fotoperíodo está aumentando, em comparação com o outono, quando o fotoperíodo está diminuindo. O percentual de células espermáticas móveis também mostra um caráter sazonal com maiores índices sendo observados durante a estação reprodutiva das fêmeas, porém sem alterações no vigor espermático (BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; TSUTSUI *et al.*, 2009; FAVRE *et al.*, 2012). Também há indicações de que a atividade do epitélio germinativo em gatos domésticos é alterado pela sazonalidade, tem sido observado um maior percentual de células tetraploides (espermatócitos primários na fase G2/M do ciclo da meiose), juntamente com maior percentual de espermátides redondas e alongadas, durante o período de dias mais curtos (fora da estação reprodutiva). Já nos dias mais longos, foram encontradas maiores taxas de transformação meiótica, de espermátides com cauda e maduras sendo liberadas na luz dos túbulos seminíferos (BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; STORNELLI *et al.*, 2009). Em conjunto, estes dados mostram que a habilidade espermatogênica dos machos de gatos domésticos é afetada pela

sazonalidade, embora a produção espermática ocorra durante o ano todo, sem influência sazonal.

1.5 JUSTIFICATIVAS

Embora existam centenas de milhares de gatos domésticos mantidos pelo homem como animais de estimação, estudos sobre a sua fisiologia são cruciais quando são utilizados como modelo experimental para os processos biológicos que acontecem em outras espécies de felinos selvagens, muitos dos quais estão ameaçados de extinção (NEUBAUER *et al.*, 2004; PUKAZHENTHI *et al.*, 2006; NOWELL, 2009). Existem muitas razões que explicam a diminuição do número de indivíduos na natureza, incluindo a ocupação pelo homem, a emergência de epidemias virais e a perda e fragmentação de habitat. A fragmentação dos habitat é de particular preocupação, porque sem os corredores para movimentação animal e troca de material genético, as populações se tornam isoladas e cada vez mais homogêneas geneticamente (PUKAZHENTHI *et al.*, 2006; NOWELL, 2009).

Pesquisas são desenvolvidas no sentido de melhorar os métodos de criopreservação de sêmen de felinos de forma a tornar possível a troca de material genético entre as populações isoladas, através da utilização de técnicas de reprodução assistida, e mesmo para a preservação de material genético em bancos de gametas (BAUDI *et al.*, 2008; FARSTAD, 2000; PUKAZHENTHI *et al.*, 2002; TERRELL *et al.*, 2012; TOYONAGA *et al.*, 2011), mas a condição da teratospermia em algumas espécies e/ou indivíduos é um fator limitante.

Mesmo espermatozóides morfologicamente normais provenientes de animais teratospérmicos apresentam falhas nos processos de capacitação, reação acrossômica e fertilização, além de resistirem menos ao processo de criopreservação (LONG *et al.*, 1996; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000; BAUDI *et al.*, 2008). Diferentemente do que ocorre com programas de seleção genética em espécies de interesse zootécnico, em programas de conservação envolvendo felinos selvagens até mesmo o menos fértil dos machos poderá ser utilizado para reprodução de forma a aumentar a variabilidade genética da espécie (AXNÉR; FORSBERG, 2007).

Adicionalmente, o conhecimento sobre a função reprodutiva do gato doméstico é também pelo fato da espécie ser utilizada em pesquisas biomédicas, uma vez que apresentam, dentre outras doenças, a Síndrome da Imunodeficiência Felina, a qual apresenta similaridades com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) que afeta o homem (HOOVER *et al.*, 1989).

No presente estudo, busca-se verificar a esteroidogênese testicular e a espermatogênese em relação à qualidade espermática e à sazonalidade em gatos domésticos. Ainda, no intuito de confirmar achados prévios do nosso laboratório (MÜLLER *et al.*, 2012), os quais indicam que um desequilíbrio na proporção entre androgênio e estrogênios intratesticulares podem estar relacionados com a teratospermia em felinos, tenta-se validar a medida da atividade da enzima aromatase em testículos de gatos domésticos. A hipótese aventada é a de desequilíbrios entre androgênios e estrogênios nos animais com má qualidade espermática podem ser decorrentes de alterações na atividade da enzima aromatase nos testículos destes indivíduos.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a esteroidogênese e espermatogênese em relação à qualidade espermática em machos de gatos domésticos. As relações entre a taxa de espermatogênese, níveis hormonais e morfologia de espermatozóides da cauda do epidídimo serão avaliadas de forma a responder questões sobre a sazonalidade reprodutiva e o fenômeno da teratospermia em felinos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Mensurar a concentração de testosterona sérica e testicular, bem como a concentração de 17β -estradiol testicular em gatos domésticos e determinar a proporção entre androgênios e estrogênios intratesticular.
2. Avaliar as características físicas e morfológicas de espermatozóides epididimários nestes mesmos indivíduos.
3. Estimar o grau de atividade espermatogênica por meio de citometria de fluxo.
4. Verificar a viabilidade do uso do ensaio de água triciada para a mensuração do grau de atividade da enzima aromatase intratesticular em gatos domésticos.
5. Verificar possíveis diferenças nos valores das variáveis estudadas conforme a sazonalidade reprodutiva.
6. Verificar a correlação entre todas as variáveis estudadas.

3 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Todo o material utilizado, a metodologia e as técnicas empregadas, bem como os resultados e a discussão específica estão descritos nos dois capítulos seguintes, os quais são compostos pelos artigos científicos produzidos a partir do desenvolvimento deste estudo.

O capítulo I, que tem como autores Katlyn Barp Meyer, Anderson Joel Martino Andrade, Andrei de Souza Santos, Graziela Müller, Katherinne Maria Spercoski, Marina Augusto Heuschkel e Rosana Nogueira de Moraes, apresenta estudo da sazonalidade reprodutiva sobre a espermatogênese e a esteroidogênese testicular em gatos domésticos considerando aspectos físicos e da morfologia espermática, da concentração de testosterona e de 17β -estradiol sérica e intratesticular e da espermatogênese analisados por citometria de fluxo.

Já o capítulo II, que tem como autores Katlyn Barp Meyer, Anderson Joel Martino Andrade, Andrei de Souza Santos, Katherinne Maria Spercoski e Rosana Nogueira de Moraes, trata da validação do ensaio de água triciada para mensuração da atividade da enzima aromatase intratesticular em gatos domésticos.

CAPÍTULO I

SEASONALITY IN MALE DOMESTIC CATS: TESTICULAR STEROIDOGENIC AND SPERMATOGENIC FUNCTION

ABSTRACT

Spermatogenic and steroidogenic activity were evaluated in randomly selected domestic cat males throughout the year aiming to investigate changes on the androgen:estrogen balance during the breeding (BS, September to February) and non-breeding (NBS, March to August) seasons and its relationship with sperm morphology. After bilateral orchiectomy, sperms were recovered from the cauda epididymis of domestic cats (n=44) and analyzed for sperm counts, motility, progressive motility and morphology. Testicular testosterone (T) and 17 β -estradiol (E2) were measured by enzyme immunoassay. Spermatogenesis was analyzed by flow cytometry. The spermatogenic activity, sperm production and some sperm abnormalities (mainly head defects, tightly coiled flagellum, bent midpiece without droplet, bent flagellum with and without droplet) were higher during BS. Testicular T was also higher during BS (ng/g; 968 \pm 139.4, BS vs. 596.4 \pm 123.5, NBS; mean \pm SEM), but different from what was expected testicular E2 did not differ (ng/g; BS; 5.8 \pm 0.5, BS vs. 5.7 \pm 0.4, NBS), giving a T:E2 ratio higher during the BS. Correlation coefficients were found between the total sperm number and the percentage of secondary sperm defects (r=0.49) and between the percentage of normal sperm with the percentage of diploid cells (r=0.50) and with the total spermatogenic transformation (r= -0.49). In conclusion, a seasonal effect on the spermatogenic activity accompanied by higher T:E2 ratio was seen during the BS, which is in accordance with the role of androgens to maintain spermatogenic activity. However, some sperm abnormalities were also higher during the BS, suggesting, that a high sperm production may occur in detriment of sperm quality, a similar mechanism that is seen in teratospermic domestic cats. Alternatively, this sperm defects may be related to transitional periods between reproductive seasons.

Key-words: seasonality; androgen:estrogen balance; spermatogenesis; epididymal sperm; domestic cat.

1 INTRODUCTION

Felines are widespread in habitats from the equator to the poles and most of these habitats experience at least some degree of seasonal fluctuation in climate and food availability, becoming more pronounced with increasing latitude (MALPAUX, 2006). To cope with the environmental fluctuations, adaptive seasonal cycles of physiological functions, behavior, and morphology also occur. One highly adaptive mechanism observed in the wild, mainly in females, is the ability to restrict breeding activity to a time of year when the most energetically challenging stages of reproduction (late pregnancy, birth, lactation, weaning of the young) coincide with annual most propitious conditions for survival of the neonate. Males may not have so pronounced reproductive seasonality as in females, for most of the species, including felines. However, even for some felid species, testis function may change from cycles of highly active to completely arrested spermatogenesis, while other ones may present only a moderate fluctuation with sperm production throughout the year (JOHNSTON; ARMSTRONG; BROWN, 1994; MORAIS *et al.*, 2002; NEWELL-FUGATE *et al.*, 2007). The magnitude of the changes on testis function depends on the magnitude of environmental challenges. In wild felids, pronounced seasonal effects on testicular function are seen only in species endemic to geographical regions with severe climatic and dietary challenges, such as in the Pallas' cat (NEWELL-FUGATE *et al.*, 2007) and snow leopard (JOHNSTON; ARMSTRONG; BROWN, 1994), with photoperiodic signals mainly synchronizing the reproductive cycles through regulation of hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Furthermore, domestication seems to be associated with a reduction or loss of reproductive seasonality in several species (SETCHELL, 1992). In contrast to their wild ancestors, sperm production in domestic cats appears to be unaffected by season. However, the data concerning seasonal quantitative and qualitative testicular parameters in cats are still controversial. Whereas previous studies concluded that male cats are not seasonal in sperm production (FRANÇA; GODINHO, 2003; SPINDLER; WILDT, 1999), more recent studies challenge those findings and suggest seasonality of sperm production (AXNÉR; FORSBERG, 2007; BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; NUÑEZ-FAVRE *et al.*, 2012; STORNELLI *et al.*, 2009; TSUTSUI *et al.*, 2009).

As the complex and cyclical process of spermatogenesis is under the control of gonadotropins and numerous locally synthesized factors, any seasonal change in testis function may also reflect changes in the testicular endocrine milieu. For example, during the last years it has become increasingly evident that the testicular androgen:estrogen balance is crucial for normal male sexual development and function (CARREAU; HESS, 2010), and also that this balance may be related to the cyclic seasonal changes on the seminiferous epithelium seen in some species. Studies dealing with the role of estrogens in seasonally determined spermatogenesis in mammals suggest an enormous influence of estrogens on male seasonality. In rodents for example, exogenously administered estradiol seems to have inductive potential for spermatogenesis activation without an increased FSH release during regressed spermatogenesis induced by short photoperiod (BILIŃSKA *et al.*, 2000; PAK, 2002). In the bank vole and in ground squirrel the activity of P450Aromatase and its localization was also found to be photoperiod dependent (BILIŃSKA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2010). In the roe deer, a typical seasonal species, the estrogens are involved in the seasonal regulation of spermatogenesis and sperm maturation since their α receptor as well as the P450Aromatase, at least in the epididymis, show striking seasonal dependencies (BLOTTNER; SCHÖN; ROELANTS, 2007; SCHÖN; BLOTTNER, 2008).

In the domestic cat a few studies have suggested a potential influence of testicular estrogens concentration or T:E2 balance on the spermatogenic activity. Occasional teratospermic cats present a tendency of lower testicular testosterone (MÜLLER *et al.*, 2012; NEUBAUER *et al.*, 2004) with higher estradiol giving a lower T:E2 ratio that was positively correlated with the percentage of normal sperm whereas estradiol correlates positively with some sperm defects (MÜLLER *et al.*, 2012). Unlike what happens in other mammals, permanent teratospermia in felids is accompanied by a high sperm production with increased Sertoli cell efficiency (JEWGENOW; PUKAZHENTHI; SCHOEN, 2013), and remarkably reduced germ cell apoptosis (JEWGENOW *et al.*, 2009). The reduced apoptosis rate could be related to mechanisms regulating proliferative/apoptosis cycles through E2 actions in the seminiferous epithelium (D'SOUZA *et al.*, 2005; LEWIS-WAMBI; JORDAN, 2009; PENTIKÄINEN *et al.*, 2000).

Based on the previous information we hypothesized that there are seasonal fluctuations on the testicular T:E2 ratio in domestic cats, leading to changes on

sperm production and quality. In this study we evaluate testicular steroidogenic and spermatogenic activity in randomly selected domestic cats throughout the year aiming to investigate changes on the androgen:estrogen balance during the breeding and non-breeding seasons and its relationship with sperm morphology.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 CHEMICALS

Unless stated otherwise, all chemicals were of reagent grade and were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA).

2.2 ANIMALS AND ORCHIECTOMY

Forty four adult and clinically healthy mixed-breed domestic cats (*F. catus*) from private owners were used in this study. The animals were subjected to bilateral orchiectomy after being anesthetized with a combination of ketamine hydrochloride (Vetaset, Fort Dodge, São Paulo, SP, Brazil; 20 mg/kg, im) and xylazine (Rompun 2%, Bayer, São Paulo, SP, Brazil; 1.0 mg/kg, im). Immediately after the anesthesia induction, a blood sample was collected by jugular venipuncture, and the serum was separated and frozen at – 20 °C for later hormonal analyses. Surgical procedure was performed according to standard techniques for cats. The Ethics Committee on Animal Research at the Federal University of Paraná approved all procedures, which were performed after receiving formal consent from the animal's owners.

2.3 COLLECTION AND ANALYSIS OF EPIDIDYMAL SPERM

Immediately after surgery, epididymis was carefully separated from the testis and the associated blood vessels and washed with warm PBS (37 °C). To release the sperm, the cauda from each epididymis was isolated and incubated with Ham's F-10 medium [supplemented with Hepes, 5% fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 UI penicillin/mL and 100 mg/mL streptomycin] in a water bath at 37 °C for 15 min. The obtained sperm suspension was centrifuged at 600 X g for 10 min and the sperm pellet was resuspended in 30 µL of Ham's F10 medium. The total volume of sperm suspension, sperm concentration, sperm motility and progressive motility (scale of 0 to 5, with 0 = no forward progression and 5 = rapid linear forward progression) were estimated according to standardized protocols for cats (MORAIS *et al.*, 2002). For sperm morphology analysis, 5 µL of the sperm suspension were fixed in 100 µL of 0.3% glutaraldehyde (v:v, in PBS) and 200 cells per sample were evaluated under phase-contrast microscopy (magnification X 1000). Sperm were classified as either normal or abnormal, if morphologic malformations were present as described previously (HOWARD *et al.*, 1990).

After being dissected the testes were immediately weighted and frozen (-20 °C) for later processing and analysis. The total testes weight was used to calculate the gonadosomatic index, which is the expression of the mass of the testes as a percentage of the total body mass (testis weight/body weight x 100).

2.4 TESTICULAR TESTOSTERONE AND 17β-ESTRADIOL MEASUREMENTS

To quantify testicular steroids, the testis was thawed, and 0.2 g of tissue was homogenized with 500 µL of PBS. The homogenate was extracted twice with a total volume of 2 mL of diethyl ether (MARTINO-ANDRADE *et al.*, 2009). The combined ether fractions were transferred to clean tubes and evaporated. The content of the tubes was recovered in an alcoholic solution (1:4, v:v in PBS) after vortex agitation and sonication (15 min). Testosterone (T) and 17β-estradiol (E2) concentrations were quantified via enzyme immunoassay (MUNRO *et al.*, 1991) using polyclonal anti-

testosterone (R156/7; 1:10 000), anti-17 β -estradiol (R0008; 1:12 000), and specific horseradish peroxidase conjugates (T-HRP; 1:20 000 and E2-HRP, 1:200 000), obtained from Dr. Coralie Munro (University of California, Davis, CA, USA). The assays were previously validated in our laboratory (MÜLLER *et al.*, 2012). Serum testosterone was quantified by using the same T enzyme immunoassay and all samples were run in duplicates. The intra- and interassay coefficients of variation were <10%. The results, after correction for dilution factor are expressed as ng/g of testis for testicular extracts and for serum samples are expressed as ng/mL.

2.5 ANALYSIS OF SPERMATOGENESIS BY FLOW CYTOMETRY

Testes were processed for flow cytometry as described previously (NEUBAUER *et al.*, 2004). Briefly, a fragment weighing between 30 and 50 mg of testicular parenchyma was finely minced with 100 mM citric acid and 0,5% (v:v) Tween 20, and the nuclei were dispersed via gentle agitation for 20 min. The suspension was filtered through nylon mesh (40 μ m) and stained with 50 μ g/mL of propidium iodide in 400 mM of Na₂HPO₄ for 30 min. For each sample 50 000 events were analyzed in a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dichson, San Jose, CA, USA). The resulting DNA histograms were analyzed using CellQuest 3.0 software (Becton-Dickson) to determine the proportions of cells in each peak, including haploid cells (1C; spermatids and sperm), diploid cells (2C; spermatogonia, preleptotene, and secondary spermatocytes, and somatic cells), and tetraploid cells (4C; all cells in the G2/M phase of the cell cycle, mainly primary spermatocytes). These proportions were used to characterize the total spermatogenic transformation (1C:2C cell ratio) and the meiotic transformation of primary spermatocytes into spermatids (1C:4C cell ratio).

2.6 STATISTICAL ANALYSIS

To evaluate the seasonal effect on the variables studied, data were subdivided into breeding season (BS; September to February – spring and summer) and non-breeding season (NBS; March to August – autumn and winter). Descriptive analyses for each group were performed, and the results are presented as mean \pm SEM. Student *t* test was used for comparisons between seasons. Pearson correlations between all the variables were also calculated for all samples collected within the breeding season. The level of significance for all tests was defined as 5%.

3 RESULTS

There were no significant differences between age, testes mass and gonadosomatic index between domestic cats during the BS and NBS, but the body weight was higher during the NBS (TABLE 1).

TABLE 1. AGE, BODY WEIGHT, TESTES MASS AND GONADOSOMATIC INDEX OF DOMESTIC CATS DURING THE BREEDING (SPRING AND SUMMER) AND NON-BREEDING (AUTUMN AND WINTER) SEASONS (MEAN \pm SEM).

	Breeding Season (n=22)	Non-breeding Season (n=22)
Age (mo)	18.7 \pm 2.2	18.9 \pm 0.9
Body weight (Kg)	3.8 \pm 0.1	4.5 \pm 0.2*
Testes mass (g)	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
Gonadosomatic index (%) †	0.06 \pm 0.004	0.06 \pm 0.004

† Gonadosomatic index (%) = (total testicular mass [g]/body weight [g]) \times 100

* Difference between groups ($p < 0.05$)

The epididymal sperm traits and morphology of sperm collected from the cauda epididymis of domestic cats showed spermatogenic activity throughout the year. However, differences between seasons were found for some of the parameters evaluated. There was an increase of 1.5 to 2.3-fold on the indexes of spermatogenic activity and sperm production during the breeding season, as seen from the cytometric analysis (FIGURE 1).

Significant increase on testicular T concentration was also found, while testicular E2 did not differ, which made the T:E2 ratio also to be higher during the breeding season. Hormonal data are summarized at table 2.

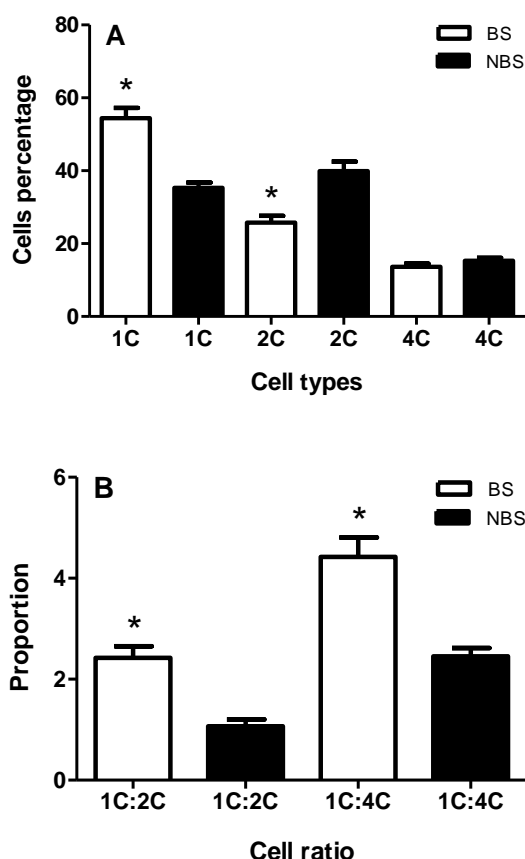


FIGURE 1. **A)** Percentages of haploid (1C), diploid (2C) and tetraploid (4C) cells; **(B)** total spermatogenic transformation (1C:2C), and meiotic index (1C:4C); as revealed by flow cytometry in testis of domestic cats during the breeding (BS; spring and summer) and non-breeding (NBS; autumn and winter) seasons. (* $P < 0.001$).

TABLE 2. TESTICULAR TESTOSTERONE AND 17β -ESTRADIOL, AND SERUM TESTOSTERONE CONCENTRATIONS IN DOMESTIC CATS DURING THE BREEDING (SPRING AND SUMMER) AND NON-BREEDING (AUTUMN AND WINTER) SEASONS (MEAN \pm SEM).

	Breeding Season (n=22)	Non-breeding Season (n=22)
Testicular testosterone (T; ng/g)	968 \pm 139.4	596.4 \pm 123.5*
Testicular 17β -estradiol (E2; ng/g)	5.8 \pm 0.5	5.7 \pm 0.4
Testicular T/E2 ratio	166 \pm 21.4	93.7 \pm 13.6*
Serum testosterone (ng/mL)	1.5 \pm 0.3	1.6 \pm 0.4

* Difference between groups ($P < 0.05$).

These changes on hormone levels and spermatogenic activity were accompanied by significant changes on sperm morphology. Although the sperm motility index did not differ between seasons, we found a higher incidence of some sperm abnormalities, mainly head defects, tightly coiled tail and bent flagella with or without cytoplasmic droplets during the breeding season (TABLE 3).

TABLE 3. SPERM TRAITS AND INCIDENCE OF MORPHOLOGICALLY NORMAL AND ABNORMAL SPERM FROM THE CAUDA EPIDIDYMIS OF DOMESTIC CATS DURING THE BREEDING (SPRING AND SUMMER) AND NON-BREEDING (AUTUMN AND WINTER) SEASONS (MEAN \pm SEM).

	Breeding Season (n=22)	Non-breeding Season (n=22)
Total sperm number ($\times 10^6$)	37.8 \pm 6.8	25.0 \pm 3.8
Sperm motility (%)	66.0 \pm 3	67.3 \pm 2.6
Sperm progressive motility (0 - 5)	3.9 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1*
Sperm motility index †	71.6 \pm 2.7	76.0 \pm 2.3
Normal sperm (%)	60.3 \pm 2.6	68.0 \pm 3.4
Primary sperm defects (%)	7.0 \pm 1	3.4 \pm 0.8**
Head defects	1.6 \pm 0.3	0.7 \pm 0.2*
Abnormal acrosome	0.6 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1
Abnormal midpiece	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2
Mitochondrial sheath aplasia	0.1 \pm 0.04	0.1 \pm 0.1
Tightly coiled flagellum	4.2 \pm 0.8	1.8 \pm 0.5*
Secondary sperm defects (%)	32.8 \pm 2.4	29.0 \pm 3.2
Bent midpiece with droplet	4.6 \pm 0.7	6.3 \pm 1.7
Bent midpiece without droplet	2.8 \pm 0.6	0.8 \pm 0.3*
Bent flagellum with droplet	7.0 \pm 1.3	2.2 \pm 0.5**
Bent flagellum without droplet	5.7 \pm 1.4	2.1 \pm 0.5*
Proximal cytoplasmic droplet	3.4 \pm 0.5	3.8 \pm 0.8
Distal cytoplasmic droplet	9.3 \pm 1.1	13.4 \pm 2.4

† Sperm motility index = (% sperm motility + [20 \times sperm progressive motility])/2

* Difference between groups ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.01$).

When considering only data collected within the breeding season, some significant correlations were found between the variables. For hormonal data the only significant correlation found was between the testicular E2 and the percentage of

sperm with abnormal acrosome ($r = 0.47$). The total sperm number of the cauda epididymis was correlated with the percentage of normal sperm ($r = -0.44$), percentage of abnormal acrosome ($r=0.56$) and percentages of secondary sperm defects ($r= 0.49$). There was also correlation between total sperm number and the percentage of haploid cells ($r = 0.53$), diploid cells ($r = -0.49$) and the total spermatogenic transformation ($r= 0.51$). The percentage of normal sperm correlated with the percentage of diploid cells ($r = 0.50$) and with the total spermatogenic transformation ($r = -0.49$).

4 DISCUSSION

Spermatogenesis occurred consistently throughout the year in the male cats evaluated in this study, which is in agreement with previous studies in domestic cats (AXNÉR; FORSBERG, 2007; BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; NUÑEZ-FAVRE *et al.*, 2012; STORNELLI *et al.*, 2009; TSUTSUI *et al.*, 2009) and also with reproductive history for domestic cats local breeders (data not shown) and data from wild felines at the local zoo (MORAIS *et al.*, 2002). However, there was a seasonal effect on both steroidogenic and spermatogenic functions. It was demonstrated an increase of 1.5 to 2.3-fold on the indexes of spermatogenic activity of the seminiferous epithelium in samples collected during the breeding season in comparison to those from the non-breeding season. There was also an increase of the same magnitude (1.5 to 1.8-fold) in the testicular testosterone concentration and T:E2 ratio (1.8 fold increase), while testicular E2 was similar between seasons. These increases in the steroidogenic and spermatogenic activities were accompanied by a higher incidence of some sperm abnormalities, mainly head defects, tightly coiled tail and bent flagella with or without cytoplasmic droplets. Together this data suggest that the testicular balance between T:E2 may be related to the mild seasonal changes in the epithelium activity in domestic cats.

As the reproductive costs for the males are lower in comparison to the energy investment made by females, it is expected that males maintain its testicular function throughout the year in environmental conditions that are not too challenging (CHEMINEAU *et al.*, 2008; MALPAUX, 2006; SPINDLER; WILDT, 1999). Besides,

urban domestic cats, as it is the case of animals included in this study, may suffer minor impacts of natural fluctuations of photoperiod and food availability since they are also exposed to artificial light and normally receive balanced commercial cat food. But, despite of that, significant changes occurred in the testis function, suggesting that other factor may be involved.

There was a clear change in the spermatogenic function between seasons, with a higher percentage of haploid cells (all types of spermatids and spermatozoa), indicating intensive meiotic activity and total spermatogenic transformation during the breeding season. During the NBS, testicular tissue showed lower mitotic and meiotic activity, resulting in higher percentage of diploid cells (2C). Our flow cytometric data is similar to the pattern presented in other species of seasonal breeders (BLOTTNER *et al.*, 1999; GOERITZ *et al.*, 2003). Despite this higher spermatogenic activity, the total sperm number did not differ between BS and NBS. This could be in part explained by differences in extragonadal excurrent system contents for each animal, of, which in turn is dependent not only on sperm production but also on male's sexual activity. Since there is no data on animals' sexual activity on the days prior to orchiectomy, we can not discuss data on total sperm more consistently.

The sperm traits and sperm morphology herein described are within the normal range of parameters describe for males in general (AXNÉR; FORSBERG, 2007) and in accordance with previous reports for normospermic cats (MÜLLER *et al.*, 2012; NEUBAUER *et al.*, 2004; PUKAZHENTHI *et al.*, 2002). However, different from that observed in roe deer (GOERITZ *et al.*, 2003) or even with previous findings in domestic cats (AXNÉR; FORSBERG, 2007; BLOTTNER; JEWGENOW, 2007) there was a tendency to highest proportion of abnormal sperm during the BS. Corroborating with this findings were the correlations between total sperm number and the percentages of sperm secondary defects ($r = 0.49$) and normal sperm ($r = -0.44$) and between the total spermatogenic transformation and the percentage of normal sperm ($r = -0.49$). In part these differences may be due to the random selection of the males in this study. The ideal would be to follow the same individuals throughout the year (BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; MORAIS *et al.*, 2002; NEWELL-FUGATE *et al.*, 2007) to be able to discern between seasonal and individual variations.

All together, the spermatogenic and sperm morphological data may suggest a mechanism similar to that seen in teratospermic domestic cats, in which the

incidence of sperm abnormalities is related to a high sperm production in detriment of sperm quality (HOWARD *et al.*, 1990; JEWGENOW *et al.*, 2009; NEUBAUER *et al.*, 2004; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000). A previous report on the ratio of round spermatids per pachytene spermatocyte, that normospermic males has 35% cell loss during spermatogenesis while the teratospermic male had only a 15% reduction (FRANÇA; GODINHO, 2003; NEUBAUER *et al.*, 2004), suggesting a defect in apoptotic removal of defective germ cells during spermatogenesis (JEWGENOW *et al.*, 2009), which could be related to differences on the testicular E2 concentrations or lower testicular T:E2 ratios. For example, rats treated orally with E2 increasing the testicular concentration of this hormone (D'SOUZA *et al.*, 2005) and in vitro cultured human seminiferous epithelium (PENTIKÄINEN *et al.*, 2000) resulted in lower rates of apoptosis, suggesting an antiapoptotic effect of this hormone. The testicular E2 concentration was previously evaluated in our laboratory (MÜLLER *et al.*, 2012) and it was found that occasional teratospermic male cats presents higher testicular E2, resulting in lower T:E2 ratio. Different from what we expected the testicular E2 concentration did not differ between BS and NBS seasons in this study, and the values found were within the range seen for the normospermic males. However, despite that, as there was a higher testicular T concentration in the samples collected during the breeding season, the T:E2 ratio was also higher during the BS. The increase in the androgen concentration and in the T:E2 is in accordance with the well-documented role of androgens to maintain a high spermatogenic activity, especially for the last steps of spermatogenesis (MCLACHLAN *et al.*, 2002). Surprisingly this higher T:E2 ratio was accompanied by a higher incidence of sperm abnormalities during the breeding season which is in opposition to our previous data for domestic cats (MÜLLER *et al.*, 2012) and men with severe idiopathic oligozoospermia ($< 5 \times 10^6$ spermatozoa/mL) and nonobstructive azoospermia (GREGORIOU *et al.*, 2012; SAYLAM; EFESOY; CAYAN, 2011; SCHLEGEL, 2012), both exhibiting a decreased testicular and serum T/E2 ratio, respectively. However, when data was analysed only during the breeding season a positive correlation between the percentage of epididymal sperm presenting acrosome defects with the testicular concentration of estradiol ($r = 0.47$) was found, which is in accordance with Müller *et al.* (MÜLLER *et al.*, 2012). Although we can not suggest any further explanation for these find, it may represent a physiological change involving the transition between the non-breeding to the breeding seasons (spring and autumn) ,

which could be better investigated with a larger number of animals in each season and analyzing data separately by season. However, changes in the T:E2 ratio probably anticipate or follow this transition periods.

5 CONCLUSION

This study shows that even in cats presenting sperm traits and serum testosterone similar to that of normospermic males, there is a seasonal effect on the spermatogenic activity, which is higher during the breeding season accompanied by higher testicular T:E2 ratio, which may lead to the increase of the percentage of sperm cells presenting abnormal morphology.

6 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the owners and institutions who provided the animals for this study. The Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico do Paraná supported this research and Katlyn B. Meyer had a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CAPÍTULO II

TESTICULAR AROMATASE ACTIVITY IN DOMESTIC CAT (*Felis catus*)

ABSTRACT

The testicular aromatase activity (AA) was measured in adult domestic cats (n=16) by the “tritiated water assay” in order to evaluate its relationship to the testicular testosterone (T) and 17 β -estradiol (E2) levels, sperm morphology and level of spermatogenic activity. Sperm recovered from cauda epididymis was evaluated for sperm counts, motility, and morphology and testicular T and E2 concentrations were measured by enzyme immunoassay. Spermatogenic activity was evaluated by flow cytometry. For the AA assays, rat ovaries and piglets testes were used as controls. All the cats presented more than 40% normal sperm and sperm traits, hormonal concentrations, and spermatogenic activity similar to that reported for normospermic cats. The AA was successfully measured in microsomal fraction from rat ovaries, while it was undetectable in the testicular microsomal fractions of cats. In homogenates, however, it was possible to detect a very low AA in cats’ testis (0.53 ± 0.1 pMol/g/h). The AA activity in homogenates of rat ovaries (219.3 ± 11.2 pMol/g/h; mean \pm SEM) and piglets’ testis (213.7 ± 7.1 pMol/g/h) were higher and inhibited in a dose-response manner when incubated with increasing fadrozole concentrations. In cats testicular homogenates the inhibition was only ~40% at the highest fadrozole concentration. As the values found for AA in domestic cats’ homogenates were close to the limit of detection of the assay we suggest that more sensitive techniques should be used in order to better understand the relationship between the level of aromatase activity, testicular estrogen synthesis and spermatogenic activity in domestic cats.

Keywords: aromatase activity; androgen:estrogen balance; spermatogenesis; epididymal sperm; domestic cat.

1 INTRODUCTION

It has become increasingly apparent that the testicular androgen:estrogen balance is crucial for normal male sexual development and function in several species (CARREAU; HESS, 2010). In the mammalian testis, this balance is under the control of several endocrine and paracrine factors, including the aromatase enzymatic complex that locally regulates the rate of conversion of androgens into estrogens. Aromatase is a microsomal member of the cytochrome P450 super family, namely aromatase cytochrome P450 (P450arom, the product of the *CYP19* gene), which when complexed with the NADPH-cytochrome P450 reductase is responsible for binding the C19 androgenic steroid substrate and catalyzing the series of reactions leading to formation of the phenolic A ring characteristic of estrogens. Aromatase catalyzes the irreversible conversion of testosterone and androstenedione into the C18 estrogens, estradiol and estrone, within the endoplasmic reticulum (SIMPSON *et al.*, 2002). Aromatase transcripts have been found in various testicular cells, including Leydig cells, Sertoli cells, spermatocytes, and spermatids in experimental animals as well as in human ejaculated spermatozoa (CARREAU; BOURAIMA-LELONG; DELALANDE, 2011). The presence of aromatase transcripts has also been detected in the male reproductive tract of domestic and wild mammals, such as boars (CONLEY, 2001), horses (HEJMEJ *et al.*, 2005), deers (SCHÖN; BLOTTNER, 2008), and bison (KOPERA *et al.*, 2010).

Traditionally considered female hormones, it is now clear that estrogens can be produced by the testis (CARREAU, 2001; HESS, 2000; RAESIDE; RENAUD, 1983) and that they can act via their specific nuclear receptors, which are widely distributed along the male reproductive tract (CARREAU; HESS, 2010), or can also exert rapid-effects by interaction with G-protein coupled transmembrane estrogen receptors (PROSSNITZ; BARTON, 2011). The presence of large quantities of estrogens in the rete testis fluid and spermatic vein blood of numerous mammals has been reported [reviewed by (HESS, 2003)]. Besides the well-known effects of serum estradiol on the regulation of hypothalamic-pituitary-gonadal axis, there are growing evidences of the role for estrogens as local regulators of gonadal and epididymal function, as revealed by the disorders seen in patients genetically deficient in aromatase (ROCHIRA *et al.*, 2005) and the estrogen receptor (ER) α knockout

mouse (NIE; ZHOU; JASSIM, 2002). Also, the aromatase null mouse, while fertile for the first few months of age, begins to present irregularities in spermatogenesis and becomes sterile after approximately 1 year, further indicating the role of estrogen for normal male reproduction (ROBERTSON *et al.*, 1999). On the other hand, aromatase over-expressing mice under the Ubiquitin C promoter (AROM+) presented a multitude of structural and functional alterations in the reproductive organs such as cryptorchidism, Leydig cell hyperplasia, disrupted spermatogenesis and infertility (LI *et al.*, 2001). These mice showed elevated serum estradiol and prolactin concentrations, combined with significantly decreased testosterone levels. Thus, the maintenance of a balance between androgen:estrogen ratio in the reproductive tract may be a critical factor in the reproductive function in males (CARREAU; HESS, 2010).

Recently, we found that randomly selected teratospermic domestic cats (*Felis catus*) present higher testicular concentrations of E2 together with a tendency of low T, giving a decreased T:E2 ratio when compared with the normospermic counterparts (MÜLLER *et al.*, 2012). There are some reports that show a lower T serum concentration in teratospermic wild (WILDT *et al.*, 1983, 1988) and domestic cats (HOWARD *et al.*, 1990), although no data on testicular or serum E2 is provided. Unlike other mammals, permanent teratospermia in felids is accompanied by a high sperm production with increased Sertoli cell efficiency (JEWGENOW; PUKAZHENTHI; SCHOEN, 2013) and remarkably reduced germ cell apoptosis (JEWGENOW *et al.*, 2009). The reduced apoptosis rate could be related to mechanisms regulating proliferation/apoptosis through E2 actions in the seminiferous epithelium.

As expected, species known to have high concentrations of testicular E2, like pigs, also display high testicular aromatase activity (MORAN, 2002). In humans, the aromatase activity was also correlated with the testicular concentration of E2 (ICHIKAWA, 1995). To our knowledge, there is no data on testicular aromatase activity in felids. Therefore, the aim of this study was to validate the tritiated water assay to measure the aromatase activity in the testis of randomly selected male cats. Further, we evaluated the data in relation to the testicular hormonal concentrations, as well as sperm morphology and level of spermatogenic activity.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 CHEMICALS

Unless stated otherwise, all chemicals were of reagent grade and were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA).

2.2 ANIMALS AND ORCHIECTOMY

Eight adult and clinically healthy mixed-breed domestic cats (*F. catus*) from private owners were used in this study. The animals were subjected to bilateral orchiectomy after being anesthetized with a combination of ketamine hydrochloride (Vetaset, Fort Dodge, São Paulo, SP, Brazil; 20 mg/kg, im) and xylazine (Rompun 2%, Bayer, São Paulo, SP, Brazil; 1.0 mg/kg, im). Surgical procedure was performed according to standard techniques for cats. The Ethics Committee on Animal Research at the Federal University of Paraná approved all procedures, which were performed after receiving formal consent from the animals' owners.

To validate the aromatase activity assay, rat ovaries and piglets testes were used as controls. Ovaries were obtained from six adult Wistar rats from the breeding stock of the animal facility of the Universidade Federal do Paraná and testes were obtained from 5 piglets submitted to surgical orchiectomy in a local farm.

2.3 COLLECTION AND ANALYSIS OF EPIDIDYMAL SPERM

Immediately after surgery, epididymis was carefully separated from the testis and the associated blood vessels and washed with Phosphate-Buffered Saline PBS at 37 °C. To release the sperm, the cauda from each epididymis was isolated and incubated with Ham's F-10 medium [supplemented with Hepes, 5% fetal calf serum

(Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 UI penicillin/mL and 100 mg/mL streptomycin] in a water bath at 37 °C for 15 min. The obtained sperm suspension was centrifuged at 600 X g for 10 min and the sperm pellet was resuspended in 30 µL of Ham's F10 medium. The total volume of sperm suspension, sperm concentration, sperm motility and progressive motility (scale of 0 to 5, with 0 = no forward progression and 5 = rapid linear forward progression) were estimated according to standardized protocols for cats (MORAIS *et al.*, 2002). For sperm morphology analysis, 5 µL of the sperm suspension were fixed in 100 µL of 0.3% glutaraldehyde (v:v, in PBS) and 200 cells per sample were evaluated under phase-contrast microscopy (magnification X 1000). Sperm were classified as either normal or abnormal, if morphologic malformations were present as described previously (HOWARD *et al.*, 1990).

After dissected the testes were immediately weighted and frozen (-20 °C) for later processing and analysis. The total testes weight was used to calculate the gonadosomatic index, which is the expression of the mass of the testes as a percentage of the total body mass (testis weight/body weight x 100).

2.4 TESTICULAR TESTOSTERONE AND 17B-ESTRADIOL MEASUREMENTS

To quantify testicular steroids, the testis was thawed and 0.2 g of tissue was homogenized with 500 µL of PBS. The homogenate was extracted twice with a total volume of 2 mL of diethyl ether (MARTINO-ANDRADE *et al.*, 2009). The ether fraction was transferred to clean tubes and evaporated. The content of the tubes was recovered in an alcoholic solution (1:4, v:v in PBS) after vortexing and sonication (15 min). T and E2 concentrations were quantified via enzyme immunoassay (MUNRO *et al.*, 1991) using polyclonal anti-testosterone (R156/7; 1:10 000), anti-17β-estradiol (R0008; 1:12 000), and specific horseradish peroxidase conjugates (T-HRP; 1:20 000 and E2-HRP, 1:200 000), obtained from Dr. Coralie Munro (University of California, Davis, CA, USA). The assays were previously validated in our laboratory (MÜLLER *et al.*, 2012). Extracts were sampled in duplicate, and the intra- and interassay coefficients of variation were <10%. The results, after correction for dilution factor, are expressed as ng/g of testis.

2.5 ANALYSIS OF SPERMATOGENESIS BY FLOW CYTOMETRY

Testes were processed for flow cytometry as described previously (NEUBAUER *et al.*, 2004). Briefly, a fragment weighing between 30 and 50 mg of testicular parenchyma was finely minced with 100 mM citric acid and 0,5% (v:v) Tween 20, and the nuclei were dispersed via gentle agitation for 20 min. The suspension was filtered through nylon mesh (40 μ m) and stained with 50 μ g/mL of propidium iodide in 400 mM of Na₂HPO₄ for 30 min. For each sample 50 000 events were analyzed in a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickson, San Jose, CA, USA). The resulting DNA histograms were analyzed using CellQuest 3.0 software (Becton-Dickson) to determine the proportions of cells in each peak, including haploid cells (1C; spermatids and sperm), diploid cells (2C; spermatogonia, preleptotene and secondary spermatocytes, and somatic cells), and tetraploid cells (4C; all cells in the G2/M phase of the cell cycle, mainly primary spermatocytes). These proportions were used to characterize the total spermatogenic transformation (1C:2C cell ratio) and the meiotic transformation of primary spermatocytes into spermatids (1C:4C cell ratio).

2.6 MEASUREMENT OF AROMATASE ACTIVITY

2.6.1 Tissues preparations

To validate the assay in our laboratory we used rat ovaries and piglets testes as positive controls. The aromatase activity was measured in the microsomal fraction of domestic cat testicles (n=8) and rat ovary (n=4) and in homogenates of domestic cat (n=8) and piglets (n=5) testes and rat ovaries (n=2). The microsomal fractions were prepared as described by Schatzman (SCHATZMAN; LAUGHLIN; BLOHM, 1988). Briefly, 0.5 g of tissues were homogenized with 4 mL of phosphate buffer containing sucrose (sucrose 250 mM, EDTA 1 mM, dithiothreitol 1 mM, pH 7.4) and then centrifuged for 10 min at 800 X g. The supernatant was subsequently

centrifuged at 9000 X g for 20 min and the supernatant centrifuged again at 120000 X g for 1 h. The microsomal fraction was suspended in 500 μ L of phosphate buffer containing glycerol (EDTA 1 mM, dithiothreitol 1 mM, 25 % glycerol, pH 7.4) and frozen (-80 °C) until assayed. For the homogenates the same amount of tissue (0.5 g) was homogenized with 1 mL of phosphate buffer containing sucrose (sucrose 250 mM, EDTA 1 mM, dithiothreitol 1 mM, pH 7.4), centrifuged (800 X g for 10 min) and the supernatant recovered and assayed. Protein quantification for both microsomal fraction and homogenates was performed by using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Assays were run in 96 well plates according to the manufacturer's instructions.

2.6.2 Tritiated water assay

The aromatase activity was determined by the "tritiated water assay" where the release of ^3H as $^3\text{H}_2\text{O}$ from 1β position of the substrate during aromatization is quantified (LEPHART; SIMPSON, 1991). A final reaction volume of 200 μ L contained microsomes or homogenates, the NADPH generating system (final concentrations: glucose-6-hydrogenase 2 UI, glucose-6-phosphate 5 mM, NADP $^+$ 1 mM, NADPH 1 mM), and the substrate 1β - ^3H -Androstenedione (^3H -A; 23,5 Ci/mmol, PerkinElmer, Boston, EUA) in 50 mM phosphate buffer pH 7.4. For validation procedures, pools of testicular homogenates from cats and piglets and pools of homogenates from rat ovaries were assayed in the presence of the aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride, which was diluted in dimethyl sulphoxide (2 μ L) and added to final concentrations ranging from 0.1 to 100 nM. All reactions were started by the addition of the substrate and were carried out at 37 °C for 2 h. To stop the reaction 1 mL of cold 30% trichloroacetic acid was added. After extraction with 1 mL of chloroform and centrifugation for 10 min at 2000 X g, the aqueous phase (600 μ L) was harvested and combined with 500 μ L of 5% charcoal and 0,5 % dextran suspension and centrifuged at 2000 X g for 30 min. An aliquot (300 μ L) of the supernatant was combined with 2 ml of scintillation liquid (EcolumeTM liquid scintillation – ICN Biomedicals, California, USA) and the tube was counted on a Beckman scintillation counter (LS380, Beckman Instruments, Schaumburg, IL). Background counts per

minute (cpm) values found for tubes incubated with all the assay components except for proteins (nonspecific tritium release- zero tubes) were subtracted from each sample. Aromatase activity is proportional to the amount of tritium in the scintillation vial and is calculated as a percentage of the total substrate added and expressed as the amount of substrate converted to tritiated water per gram of protein per hour (pMol/g/h). Different amounts of the substrate 1β - 3 H-Androstenedione (30, 100 or 150 nM) and proteins (50 μ g up to 3 mg) were used during the assay validation steps (see details in the results session). Assay sensitivity was defined as the mean plus 2.0 standard deviations of the zero tubes and calculated on the basis of the mean amount of protein used in each assay, which corresponds to 0.27 pMol/g/hr.

2.7 STATISTICAL ANALYSIS

Descriptive analyses of the data were performed, and the results are presented as mean \pm SEM. Means for aromatase activity of different species or assay conditions were compared by ANOVA, followed by Tukey post-hoc test. Pearson correlations between all the variables were calculated and the level of significance for all tests was defined as 5%.

3 RESULTS

The domestic cats estimated age ranged from 12 to 36 mo with a mean (\pm SEM) value of 24.1 ± 3.4 mo. The mean (\pm SEM) body weight was 4.5 ± 0.2 kg and the testis weight was 1.4 ± 0.1 g, giving a mean (\pm SEM) gonadosomatic index of 0.06 ± 0.004 %.

The epididymal sperm traits and morphology of sperm collected from the cauda epididymis of domestic cats are presented in table 1. Hormonal and flow cytometry data are presented in tables 2 and 3, respectively.

TABLE 1. SPERM TRAITS AND INCIDENCE OF MORPHOLOGICALLY NORMAL AND ABNORMAL SPERM FROM THE CAUDA EPIDIDYMIS OF DOMESTIC CATS (N=8).

Parameters	Mean \pm SEM
Total sperm number ($\times 10^6$)	44.8 \pm 10.5
Sperm motility (%)	61.8 \pm 5.3
Sperm progressive motility (0 to 5)	3.6 \pm 0.2
Sperm motility index †	66.6 \pm 4.7
Normal sperm (%)	60.9 \pm 2.2
Primary sperm defects (%)	7.0 \pm 1.2
Head defects	1.9 \pm 0.3
Abnormal acrosome	0.7 \pm 0.2
Abnormal midpiece	0.6 \pm 0.2
Tightly coiled flagellum	3.6 \pm 1.3
Secondary sperm defects (%)	32.1 \pm 2.1
Bent midpiece with droplet	5.4 \pm 1.2
Bent midpiece without droplet	3.4 \pm 0.7
Bent flagellum with droplet	3.2 \pm 0.8
Bent flagellum without droplet	4.6 \pm 0.7
Proximal cytoplasmic droplet	3.2 \pm 0.5
Distal cytoplasmic droplet	12.2 \pm 2.6

† Sperm motility index = (% sperm motility + [20 \times sperm progressive motility])/2

TABLE 2. TESTICULAR TESTOSTERONE AND 17 β -ESTRADIOL CONCENTRATIONS AND TESTICULAR T:E2 RATIO IN DOMESTIC CATS (MEAN \pm SEM).

Parameters	Mean \pm SEM
Testicular testosterone (T; ng/g)	1731 \pm 485
Testicular 17 β -estradiol (E2; ng/g)	5.2 \pm 0.6
Testicular T/E2 ratio	285.0 \pm 74.1

TABLE 3. PERCENTAGES OF HAPLOID (1C), DIPLOID (2C) AND TETRAPLOID (4C) CELLS, TOTAL SPERMATOGENIC TRANSFORMATION (1C:2C) AND MEIOTIC INDEX (1C:4C) AS REVEALED BY FLOW CYTOMETRY IN THE TESTIS OF DOMESTIC CATS (N=8; MEAN \pm SEM).

Parameters	Mean \pm SEM
Haploid cells (1C)	54.8 \pm 1.3
Diploid cells (2C)	25.2 \pm 0.8
Tetraploid cells (4C)	14.2 \pm 0.6
1C:2C	2.2 \pm 0.9
1C:4C	3.9 \pm 0.2

3.1 AROMATASE ACTIVITY ASSAY VALIDATION IN RAT OVARIES AND PIGLET TESTES

The aromatase activity was successfully measured by using the tritiated assay in pools of rat ovaries either for microsomal proteins or homogenates. The total aromatase activity was increased with increasing amounts of substrate as shown in Fig. 1. Also, we were able to measure aromatase activity in testicular homogenates of piglets, which do not differ from the mean values found for rat ovaries homogenates (TABLE 4).

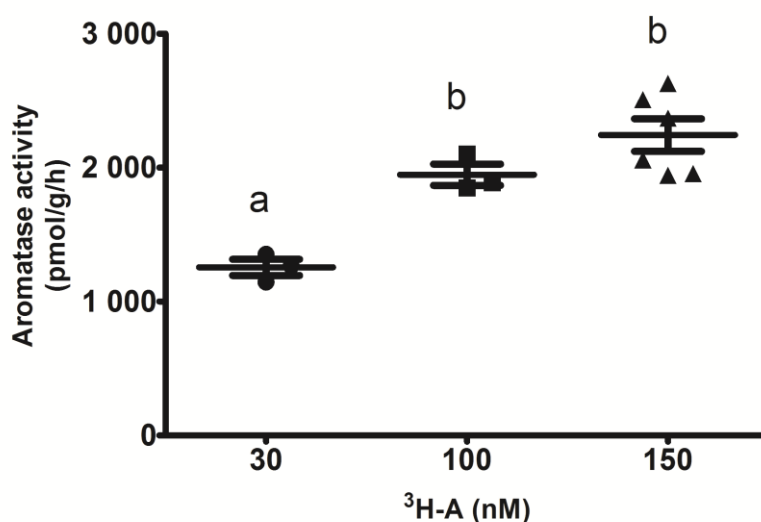


FIGURE 1. Aromatase activity measured in ovarian microsomal protein (50 μ g) obtained from rats at the estrous phase. Incubations were made with 30, 100 or 150 nM of 1β - 3 H-androstenedione (3 H-a). Values are mean \pm sem of triplicate incubations; superscript letters indicate differences between assays ($p < 0.001$).

TABLE 4. AROMATASE ACTIVITY RECOVERED FROM INCUBATIONS OF TESTICULAR HOMOGENATES OF DOMESTIC CATS AND PIGLETS AND OVARY HOMOGENATES FROM RATS, INCUBATED WITH 150 nM OF 1β - 3 H-ANDROSTENEDIONE (3 H-A) AND DIFFERENT AMOUNTS OF PROTEIN. VALUES ARE MEAN \pm SEM OF TRIPLICATE INCUBATIONS.

Tissue homogenate	N	Protein (mg)	Aromatase activity (pMol/g/h)
Domestic cat testes	8	3.3 \pm 0.3	0.53 \pm 0.1 ^a
Piglet testes	5	3.1 \pm 0.2	213.7 \pm 7.1 ^b
Rat ovary	2	2.3 \pm 0.1	219.3 \pm 11.2 ^b

^{a, b} Differences between species ($p < 0.0001$).

As expected, a typical inhibitory dose-response curve was produced with incubations of rat ovaries homogenates with increasing concentrations of the aromatase inhibitor fadrozole (Fig. 2a). A similar inhibitory dose-response curve was observed for testicular homogenates from piglets (Fig. 2b). The IC₅₀ for rat ovary was 1.95 nM whereas for piglet testicle it was 3.97 nM of Fadrozole.

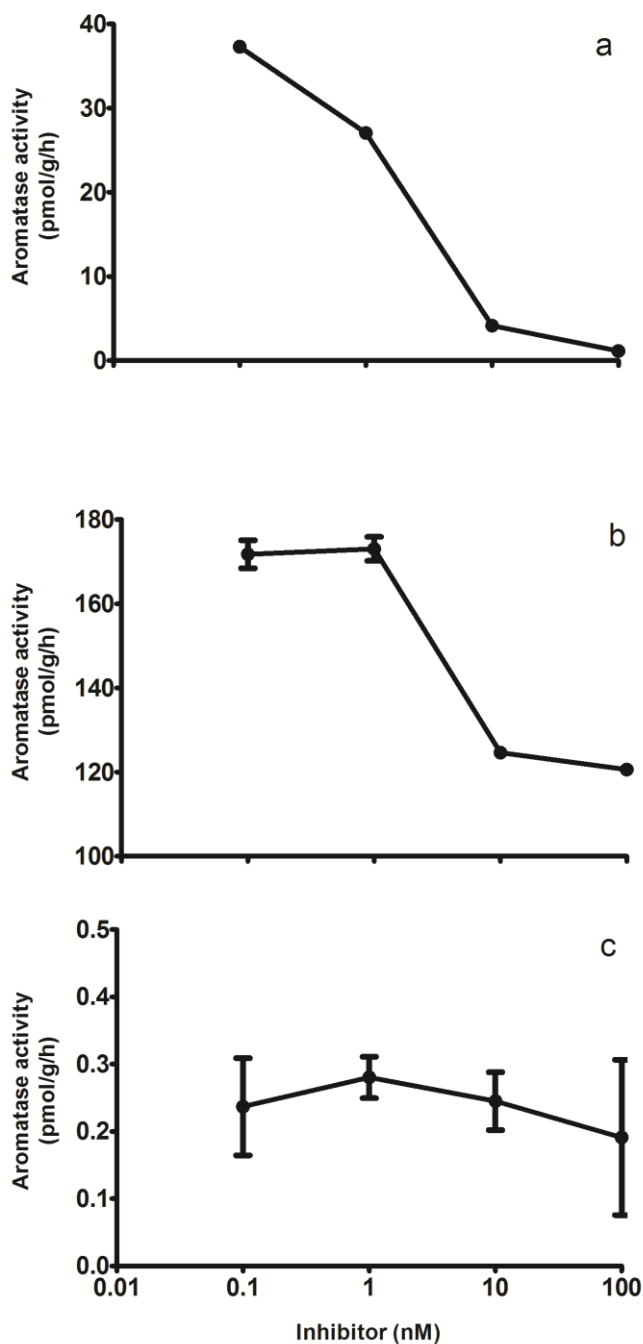


FIGURE 2. Aromatase activity inhibition curve in homogenates of rat ovary (a), and piglet's (b) and domestic cat's (c) testes in the presence of increasing concentrations of the aromatase inhibitor Fadrozole. Values are Mean \pm SEM of triplicate incubations. Note differences in the X axis scale among species.

3.2 AROMATASE ACTIVITY MEASURED IN MICROSOMES AND HOMOGENATES OF DOMESTIC CAT TESTICLES

It was not possible to detect any aromatase activity in microsomal protein from domestic cat testes by using the tritiated assay, either with 50 or 200 µg of protein added to the assay tube in the presence of 150 nM of ^3H -A. All cpm values measured for domestic cats samples did not differ from the background counts (zero tubes).

Nevertheless, when the assays were run with testes homogenates, it was possible to detect aromatase activity in domestic cats. As expected the mean aromatase activity in domestic cats was much lower than that of rat ovaries or piglets testes (Table 4). As the values found for domestic cat homogenates were too close to the limit of detection of the assay (0.27 pMol/g/h), the inhibitory dose-response curve obtained do not indicate a typical response, although a reduction of approximately 40% in the cpm values was seen in the tubes incubated with the higher dose of inhibitor (Fig. 2c).

3.3 CORRELATIONS

No correlations were found between the aromatase activity in domestic cat testis and any of the other variables analyzed, including the testicular E2 concentrations. However, there were significant correlations between testicular E2 concentration and gonadosomatic index ($r=0.77$) testicular T ($r=0.79$), percentage of haploid cells ($r=0.84$), total spermatogenic transformation ($r=0.72$), and meiotic index ($r=0.85$).

4 DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to demonstrate aromatase activity in domestic cat testis. As expected, the aromatase activity in the homogenates of rat ovary and piglet testis was significantly higher than that of the domestic cat testis. Nevertheless, unlike the data described for males known for its exceptionally high testicular aromatase activity such as the pig and the stallion (GAILLARD; SILBERZAHN, 1987), aromatase activity was undetectable in the microsomal fraction of the domestic cat testis, even when the amount of protein was increased from 50 to 200 µg. We could infer that the assay sensitivity does not allow the detection of aromatase activity in small amounts of microsomal protein for tissues displaying low activity as the domestic cat testis. On the other hand, tissues known to have high aromatase activity, such as the rat ovary and the piglet testis, can be successfully used. However, comparisons between the present results of aromatase activity with those previously reported for both rat ovaries (ODUM; ASHBY, 2002; SATOH *et al.*, 2008) and piglet testis (MORAN, 2002) are of limited value due to the wide range of differences on the experimental procedures used, such as lineage and age of animals and tissues preparation. Nevertheless, the aromatase activity of the rat ovary homogenates was inhibited in a dose-response manner when incubated with Fadrozole, giving a IC₅₀ of 1.95 nM, which is in agreement with the range of 1 – 7 nM of Fadrozole described in other studies (ODUM; ASHBY, 2002; SATOH *et al.*, 2008), while the IC₅₀ found for the piglet testis (3.97nM) is a little higher, but also within the range described for rat ovaries.

Testicular aromatase activity levels may define the testicular androgen:estrogen balance by regulating the rate of conversion of androgens into estrogens. It was previously reported that men presenting idiopathic infertility presented a high testicular aromatase activity, which was highly correlated to testicular E₂ concentration ($r=0.88$) and T:E₂ ratio ($r = 0.85$), suggesting that this increased aromatase activity might be related to impaired spermatogenesis (ICHIKAWA, 1995). Many infertile men with severe idiopathic oligozoospermia ($< 5 \times 10^6$ sperm cells/mL) and nonobstructive azoospermia can exhibit a decreased serum T:E₂ ratio without alteration in FSH and LH levels. When treated with the aromatase inhibitor letrozole or anastrozole, serum T and E₂ values were normalized and sperm

motility, sperm number and ejaculate volume were improved (GREGORIOU *et al.*, 2012; SAYLAM; EFESYOY; CAYAN, 2011; SCHLEGEL, 2012). Pavlovich *et al.* (PAVLOVICH *et al.*, 2001) characterized men with normal spermatogenesis as having a serum T:E2 ratio of 14.5, whereas men with severe infertility had a mean serum T:E2 ratio of 6.9, and based on these observations, a cutoff of 10 was set as the lower limit of normal serum T:E2 ratio in men (calculated using T in ng/dL, and E2 as pg/mL). These studies demonstrate that defective sperm production is commonly accompanied by an excess of aromatase activity that can be reverted with the use of aromatase inhibitors, improving semen characteristics.

Similarly, aromatase inhibitor treatment in oligo and azoospermic dogs with high serum E2 concentration and low T and LH has been reported to increase their ejaculate volume and sperm number, motility and viability (KAWAKAMI *et al.*, 2004). In domestic cats we have recently found that randomly selected teratospermic males had higher testicular concentration of E2 together with a tendency of low T, giving a decreased T:E2 ratio when compared with the normospermic counterparts (MÜLLER *et al.*, 2012). Besides, testicular E2 correlated with the percentages of normal sperm ($r = -0.55$), primary defects ($r = 0.58$), and abnormal acrosomes ($r = 0.64$) (MÜLLER *et al.*, 2012), suggesting that increases in the testicular E2 may be related to the development of sperm abnormalities in cats. These findings together with the knowledge that permanent teratospermia in felids is accompanied by a high sperm production with remarkable increase of Sertoli cell efficiency (JEWGENOW; PUKAZHENTHI; SCHOEN, 2013), and reduced germ cell apoptosis (JEWGENOW *et al.*, 2009) lead us to hypothesize that unbalances in the T:E2 ratio in cats may be related to the pathophysiology of teratospermia in felids, and that consequently it may also be related to the level of testicular aromatase activity. In this study none of the males had a percentage of morphologically abnormal sperm below 40% and all the cats evaluated presented sperm traits, hormonal parameters, as well as spermatogenic activity similar to that reported for normospermic males (HOWARD *et al.*, 1990; JEWGENOW *et al.*, 2009; NEUBAUER *et al.*, 2004). Besides, the aromatase activity did not correlate with any of the sperm morphological abnormalities, neither with the testicular concentrations of E2 and T or testicular T:E2 ratio. Although unexpected, this lack of correlation may be related to the reduced sample size and the good quality of the samples evaluated. However, as the values detected for testicular aromatase activity for the domestic cats in our study were near

to the limit of detection of the assay, the biological significance of these findings remains to be clarified through some other technique such as the detection of estrone produced by HPLC and/or the evaluation of aromatase expression in the testis and other reproductive tissues. Furthermore, to evaluate if testicular aromatase activity differs between normospermic and teratospermic cats it would be also valuable to select testis from permanent teratospermic male cats, based on Sertoli cell efficiency (ratio of round spermatids to Sertoli cells), as suggested by Jewgenow *et al.* (1999). Despite the lack of correlation of aromatase with the other variables, testicular E2 did correlate with the percentage of haploid cells (1C) and with the total spermatogenic transformation (1C:2C) and meiotic index (1C:4C), although we cannot infer that these findings indicate some antiapoptotic effect of this hormone on the seminiferous epithelium.

In conclusion we were able to detect very low levels of aromatase activity in domestic cat testis. However, due to the lack of correlation with any of the other reproductive traits evaluated, including testicular E2 concentration, we suggest that more sensitive techniques should also be used to evaluate testicular estrogen synthesis in domestic cat and its relationship to spermatogenic activity.

5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the owners and institutions who provided the animals for this study. The Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico do Paraná supported this research and Katlyn B. Meyer had a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

4 DISCUSSÃO GERAL

4.1 FUNÇÃO ESPERMATOGÊNICA E ESTEROIDOGENICA EM GATOS DOMÉSTICOS E SAZONALIDADE

A espermatogênese ocorreu consistentemente ao longo de todo o ano nos gatos domésticos avaliados neste estudo, o que está de acordo com estudos prévios em gatos domésticos (AXNÉR; FORSBERG, 2007; BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; NUÑEZ-FAVRE *et al.*, 2012; STORNELLI *et al.*, 2009; TSUTSUI *et al.*, 2009), com o histórico de reprodução de criadouros locais (dados não mostrados) e com dados de felinos selvagens do zoológico local (MORAIS *et al.*, 2002). Entretanto, houve efeito sazonal nas funções esteroideogênica e espermatogênica.

Foi demonstrado um aumento de 1,5 a 2,3 vezes no índice de atividade espermatogênica do epitélio seminífero nas amostras coletadas durante a estação reprodutiva (ER) quando comparadas com aquelas coletadas durante a estação não reprodutiva (ENR). Também foi verificado um aumento de mesma magnitude (1,5 a 2,3 vezes) na concentração de testosterona intratesticular e na proporção T:E2 (aumento de 1,8 vezes), enquanto que a concentração de estradiol não diferiu entre as estações. Este aumento das atividades espermatogênica e esteroideogênica foram acompanhadas por um aumento na incidência de alguns defeitos espermáticos, principalmente defeitos de cabeça, cauda fortemente enrolada e cauda dobrada com ou sem gota citoplasmática. Em conjunto estes dados sugerem que o balanço entre T:E2 pode estar relacionado com as moderadas mudanças sazonais de atividade do epitélio germinativo em gatos domésticos.

De forma geral, para os machos a reprodução depende de um baixo gasto energético, quando comparado com aquele despendido pelas fêmeas. Então, é esperado que eles mantenham a função testicular ao longo do ano em condições ambientais que não são desafiadoras (CHEMINEAU *et al.*, 2008; MALPAUX, 2006; SPINDLER; WILDT, 1999). Gatos domésticos urbanos, como é o caso dos animais incluídos neste estudo, devem sofrer menor impacto e influência das flutuações naturais de foto período e de disponibilidade de alimentos, pois são expostos a luz artificial e normalmente recebem ração comercial balanceada. Entretanto, picos de

nascimento de filhotes são observados durante a primavera e o verão (ROBINSON; COX, 1970), principalmente devido a sazonalidade do ciclo estral das fêmeas que são poliétricas sazonais (BROWN, 2011; SPINDLER; WILDT, 1999).

Embora o número total de espermatozóides não tenha diferido entre a ER e a ENR, foi verificada maior atividade do epitélio germinativo nas amostras coletadas durante a ER. O percentual de células haplóides (compreende todos os tipos de espermátides e espermatozóides) foi maior nas amostras da ER, indicando intensa atividade mitótica e meiótica neste período. Por outro lado, as amostras coletadas durante a ENR apresentaram maior proporção de células diplóides (2C), demonstrando menor atividade do epitélio germinativo. Como o total de espermatozóides contidos no meio extragonadal depende do nível de atividade sexual do indivíduo, nós não podemos discutir estes dados pois não temos informações à respeito do nível de atividade sexual de cada macho imediatamente antes do dia do procedimento de orquiectomia. Entretanto, o perfil de atividade espermatogênica encontrado pela avaliação por citometria de fluxo é semelhante àquele encontrado em machos de espécies sazonais, como no mamífero mustelídeo (*Mustela vison*; BLOTTNER *et al.*, 1999) e em cervídeo (*Capreolus capreolus*; BLOTTNER, 1996).

Neste estudo as amostras espermáticas colhidas da cauda do epidídimo dos gatos domésticos apresentaram morfologia semelhante àquela encontrada em gatos considerados normospermicos (HOWARD *et al.*, 1990; MÜLLER *et al.*, 2012; NEUBAUER *et al.*, 2004; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000; PUKAZHENTHI *et al.*, 2002) e está dentro dos parâmetros considerados para um espermiograma normal (AXNÉR; FORSBERG, 2007). Entretanto, diferente do que foi observado em cervídeos (BLOTTNER *et al.*, 1996; GOERITZ *et al.*, 2003) ou mesmo em estudos prévios em gatos domésticos (AXNÉR; FORSBERG, 2007; BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; NUÑEZ-FAVRE *et al.*, 2012), ocorreu uma tendência a maior percentual de espermatozóides defeituosos nas amostras coletadas durante a ER. Corroborando com este achado estão as correlações encontradas entre o número total de espermatozóides e o percentual de defeitos secundários ($r = 0,49$) e espermatozóides normais ($r = -0,44$) e entre a taxa de transformação espermatogênica total e o percentual de espermatozóides normais ($r = -0,49$). Em parte essas diferenças podem ser devido à seleção randômica dos machos deste estudo. O ideal seria analisar os parâmetros de um mesmo indivíduo ao longo do

ano (BLOTTNER; JEWGENOW, 2007; MORAIS *et al.*, 2002; NEWELL-FUGATE *et al.*, 2007) para possibilitar o discernimento entre variações individuais e sazonais.

Em conjunto, estes dados evidenciam que de forma similar ao que acontece em animais teratospérmicos, a alta atividade espermatogênica durante a ER pode ocorrer em detrimento da qualidade espermática (HOWARD *et al.*, 1990; JEWGENOW *et al.*, 2009; NEUBAUER *et al.*, 2004; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000). Gatos domésticos teratospérmicos persistentes apresentam alta produção espermática conseguida por meio de maior quantidade de tecido produtor de espermatozóides (NEUBAUER *et al.*, 2004), maior número de células germinativas por célula de Sertoli (JEWGENOW *et al.*, 2013), associado com menor índice apoptótico durante a espermatogênese (JEWGENOW *et al.*, 2009). Estudos anteriores demonstraram que gatos domésticos normospérmicos apresentam 35% de perdas celulares durante a espermatogênese, porém gatos teratospérmicos apresentam perda de apenas 15% (FRANÇA; GODINHO, 2003; NEUBAUER *et al.*, 2004), sugerindo uma remoção ineficiente de células germinativas defeituosas (JEWGENOW *et al.*, 2009), a qual pode estar relacionada com as diferenças de concentração de E2 ou com a menor proporção T:E2.

Por exemplo, ratos tratados com E2, aumentando a concentração deste hormônio no meio intratesticular (D'SOUZA *et al.*, 2005) e em cultivo de epitélio seminífero de homens *in vitro* recebendo E2 (PENTIKÄINEN *et al.*, 2000), apresentaram menores taxas de apoptose, sugerindo um efeito antiapoptótico destes hormônio. Estudos que tratam da função dos estrógenos na determinação da sazonalidade da espermatogênese em mamíferos sugerem uma enorme influência do hormônio “feminino” sobre o trato reprodutor masculino. Em roedores, por exemplo, a administração de E2 parece ter um papel de ativação da espermatogênese durante o período induzido (foto períodos curtos) de regressão da espermatogênese (BILINSKA *et al.*, 2000; PAK, 2002). Na ratazana (*Myodes glareolus*) e no esquilo (*Citellus dauricus*) a atividade da aromatase e sua localização também apresentam dependência com o foto período (BILINSKA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2010). No cervídeo, uma espécie tipicamente sazonal, os estrógenos estão envolvidos na regulação sazonal da espermatogênese e maturação espermática pois foi observado que os receptores do tipo α assim como a enzima aromatase, pelo menos nos epidídimos, demonstram uma forte dependência sazonal (STEFFEN *et al.*, 2007; SCHÖN; BLOTTNER, 2008).

A concentração de E2 intratesticular foi avaliada previamente em nosso laboratório (MÜLLER *et al.*, 2012) e foi encontrada menor concentração em machos considerados teratospérmicos ocasionais, resultando em menor proporção T:E2. Diferente do que era esperado, a concentração de E2 não diferiu entre a ER e a ENR neste estudo, e os valores encontrados estão de acordo com aqueles encontrados em machos normospérmicos (MÜLLER *et al.*, 2012). Entretanto, como houve maior concentração de T nas amostras coletadas durante a ER, a proporção T:E2 foi também maior durante este período.

A maior concentração de T e da proporção T:E2 está de acordo com o papel desempenhado pelos andrógenos na manutenção da maior atividade espermatogênica (McLACHLAN *et al.*, 2002). Blottner e Jewgenow (2007) observaram mudanças na concentração de testosterona intratesticular em gatos domésticos ao longo do ano, com menores valores durante o outono com aumento progressivo até o final do inverno e as concentrações médias foram maiores durante a primavera quando comparada com a média do outono. Nossos resultados corroboram com este achado. Embora não tenhamos realizado análise mensal dos níveis hormonais, foi possível verificar a maior concentração de testosterona nas amostras colhidas durante a ER. De forma surpreendente a maior proporção T:E2 foi acompanhada pela maior incidência de espermatozóides defeituosos durante a ER, o que vai de encontro com dados anteriores descritos para gatos domésticos (MÜLLER *et al.*, 2012) e para homens que apresentando oligozoospermia idiopática severa ($<5 \times 10^6$ espermatozóides/mL) e azoospermia não-obstrutiva (GREGORIOU *et al.*, 2012; SAYLAN *et al.*, 2011; SCHLEGEL, 2012), ambos apresentando uma menor proporção T:E2 testicular e sérica, respectivamente.

Entretanto, quando os dados são analisados somente com as amostras da ER foi encontrada correlação positiva entre o percentual de espermatozóides epididimários apresentando defeitos de acrossoma com a concentração intratesticular de E2 ($r = 0,47$), de acordo com o que foi encontrado por Müller *et al.* (2012). Evidências mostram que mesmo concentrações muito baixas de xenobióticos, todos considerados fracamente estrogênicos exercem efeito agudo e direto sobre a função de espermatozóides maduros acelerando, significativamente, sua capacitação e reação de acrossoma (ADEOYA-OSIGUWA; FRASER, 2000; FRASER *et al.*, 2006; MAZUR; KOSHIMOTO, 2002). Entretanto, como os

espermatozóides não foram avaliados para tal finalidade não podemos relacionar estes achados.

Embora nós não possamos sugerir qualquer explicação adicional para estes achados, eles podem estar demonstrando uma mudança fisiológica envolvendo a transição entre a ENR e a ER (primavera e outono), a qual poderia ser melhor investigada com um número maior de animais por estação e analisados separadamente. Porém, a alteração na proporção T:E2 provavelmente antecipa ou é subsequente à estas transições entre os períodos.

4.2 ATIVIDADE DE AROMATASE EM TESTÍCULO DE GATO DOMÉSTICO

O presente estudo é para o nosso conhecimento o primeiro que demonstra atividade da enzima aromatase em testículos de gatos domésticos. Como esperado, a atividade da enzima aromatase em homogenato de ovário de rata e em testículo de porco foi significativamente maior do que aquela em testículo de gato doméstico. Entretanto, diferente do encontrado em garanhões, por exemplo, que apresentam alta atividade da enzima aromatase (GAILLARD; SILBERZAHN, 1987), a atividade enzimática não foi detectada na fração microssomal de testículos de gatos domésticos, mesmo quando a quantidade de proteína foi aumentada de 50 para 200 µg. Nós podemos inferir que a sensibilidade do ensaio não permitiu a detecção de um nível tão baixo de atividade em baixa concentração proteica, desde que em ovários de ratas, utilizados como controles positivos, altos níveis de atividade foram detectados.

Comparações entre a média dos valores de atividade da enzima aromatase descritos previamente para ovários de ratas (ODUM; ASHBY, 2002; SATOH *et al.*, 2008) e para testículos de porcos (MORAN, 2002) tem sua interpretação limitada devido a ampla variedade de diferenças experimentais utilizadas, como a linhagem e idade dos animais utilizados e a preparação dos tecidos. Entretanto, a atividade da enzima aromatase em homogenatos de ovários de ratas foi inibida de forma dose-dependente quando incubada com Fadrozole, resultando em uma IC₅₀ de 1.95 nM que está dentro da variação de 1 – 7 nM de fadrozole descrita na literatura (ODUM; ASHBY, 2002; SATOH *et al.*, 2008), enquanto a IC₅₀ descrita para testículos de

porcos (3.97 nM) é um pouco mais alta mas se mantém dentro da variação descrita para ovários de ratas.

A atividade da enzima aromatase intratesticular deve definir o balanço entre andrógenos:estrógenos regulando a taxa de conversão de androgênios em estrogênios. Um estudo demonstrou que homens com infertilidade idiopática apresentaram alta atividade da enzima aromatase intratesticular, a qual foi correlacionada com a concentração intratesticular de E2 ($r = 0,88$) e com a razão T:E2 ($r = 0,85$), sugerindo que o aumento da atividade da enzima aromatase pode estar comprometendo a eficiência da espermatogênese (ICHIKAWA, 1995). Muitos homens inférteis que apresentam oligozoospermia severa idiopática ($< 5 \times 10^6$ sperm cells/mL) e azoospermia não-obstrutiva podem apresentar menor razão T/E2 sérica sem alterações nos níveis de FSH e LH. Quando tratados com inibidores de aromatase como letrozole ou anastrozole os valores séricos de T e E2 são normalizados e a motilidade espermática, número de espermatozóides e volume do ejaculado são aumentados (GREGORIOU *et al.*, 2012; SAYLAM *et al.*, 2011; SCHLEGEL, 2012). Pavlovich *et al.*(2001) verificou que homens com espermatogênese normal apresentam a razão T/E2 sérica de 14,5, enquanto aqueles com algum distúrbio levando à infertilidade tem em média a razão T/E2 sérica de 6,9 e baseado nestas observações propôs uma linha de corte de 10, como sendo o limite mínimo considerado normal para a razão T/E2 sérica em homens (calculado usando T em ng/dL e o E2 como pg/mL). Este estudo demonstrou que a falha severa na produção espermática é comumente acompanhada por excesso de atividade da enzima aromatase que pode ser revertido com o uso de inibidores de aromatase, melhorando as características seminíferas.

Da mesma forma, o tratamento com inibidores de aromatase implantados na forma de cápsula subcutânea em cães com oligo e zoospermia com alta concentração de E2 e baixa de T e LH séricos foi capaz de aumentar o volume ejaculado, o número de espermatozóides, assim como sua motilidade e viabilidade (KAWAKAMI *et al.*, 2004). Em nosso laboratório foi recentemente encontrado em gatos domésticos teratospérmicos ocasionais maior concentração de E2 intratesticular com tendência a menor concentração de T, resultando em menor razão T/E2 quando comparados com gatos normospérmicos (MÜLLER *et al.*, 2012). Além disso, a concentração de E2 intratesticular correlacionou com o percentual de espermatozóides normais ($r = -0,55$), defeitos primários ($r = 0,58$) e acrossoma

anormal ($r = 0,64$) (MÜLLER *et al.*, 2012), sugerindo que o aumento da concentração de E2 intratesticular pode estar relacionado com o desenvolvimento de anormalidades morfológicas em espermatozóides de gatos domésticos.

Em conjunto, estes achados e sabendo que a teratospermia em felinos é acompanhada por alta produção espermática com alta eficiência das células de Sertoli (JEWGENOW *et al.*, 2013) e redução da apoptose de células germinativas (JEWGENOW *et al.*, 2009) nos levam a hipotetizar que o desbalanço na razão T/E2 em gatos pode estar relacionado com a patofisiologia da teratospermia em felinos e, conseqüentemente, pode estar relacionado com o nível de atividade da enzima aromatase intratesticular. Um estudo com administração exógena de estradiol demonstrou um efeito antiapoptótico estágio-específico no epitélio germinativo de ratos machos atribuído à baixa concentração de testosterona e a alta concentração de estradiol intratesticulares (D'SOUZA *et al.*, 2005). Efeito similar foi visto em epitélio seminífero humano tratado *in vitro* com estradiol, inibindo efetivamente a apoptose de células germinativas durante a espermatogênese (PENTIKÄINEN *et al.*, 2000). Por outro lado, camundongos “knock-out” para o gene da enzima aromatase apresentaram aumento da apoptose de espermátides redondas causados pela deficiência de estrógenos (ROBERTSON *et al.*, 1999).

Neste estudo nenhum dos machos avaliados apresentou mais de 60% de espermatozóides anormais e todos apresentaram parâmetros espermáticos, perfil hormonal, assim como número total de espermatozóides similar ao que é visto em gatos normospérmicos (HOWARD *et al.*, 1990; JEWGENOW *et al.*, 2009; NEUBAUER *et al.*, 2004). Entretanto, a atividade de aromatase não correlacionou com nenhuma das anormalidades morfológicas espermáticas, nem tanto com as concentrações intratesticulares de T e E2 ou com a proporção T/E2. Embora inesperada, esta falta de correlação pode estar relacionada com o reduzido tamanho amostral e com a boa qualidade espermática das amostras avaliadas.

Porém, os valores detectados para atividade de aromatase em testículos de gatos domésticos neste estudo estão próximas ao limite mínimo de detecção do ensaio. A significância biológica destes achados devem ser esclarecidos por alguma outra técnica como detecção de estrona produzida por HPLC e/ou a avaliação da expressão de aromatase no testículo e em outros tecidos do trato reprodutor masculino. Além disso, para avaliar se a atividade de aromatase intratesticular difere entre animais normospérmicos e teratospérmicos, seria válido utilizar animais

teratospérmicos permanentes selecionados com base na produção espermática e na eficiência das células de Sertoli (razão de espermátides redondas por célula de Sertoli), como sugerido por Jewgenow *et al.* (2013).

Embora a atividade de aromatase não tenha correlacionado com nenhuma outra variável analisada, a concentração de E2 intratesticular correlacionou com o percentual de células haploides (1C) e com as taxas de transformação espermatogênica total (1C:2C) e índice meiótico (1C:4C), entretanto não podemos inferir que estes achados indiquem algum efeito antiapoptótico deste hormônio no epitélio seminífero.

5 CONCLUSÕES

Sob as condições experimentais aqui descritas e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1) Não houve variação sazonal dos níveis de testosterona sérica. Entretanto, a concentração de testosterona e a proporção T:E2 intratesticulares foram maiores durante a estação reprodutiva;

2) A atividade espermatogênica foi maior nas amostras coletadas durante a estação reprodutiva, acompanhando a maior concentração de testosterona e proporção T:E2 intratesticulares;

3) Todos os animais deste estudo são caracterizados como normospermicos. Entretanto, determinados defeitos espermáticos ocorreram em maior proporção nas amostras coletadas durante a estação reprodutiva;

4) Foi mensurada a atividade da enzima da aromatase em níveis muito baixos em homogenato de testículo de gatos domésticos, porém não houve correlação com nenhuma das demais variáveis analisadas. Sugere-se que técnicas mais sensíveis deverão ser utilizadas para avaliar a atividade da enzima aromatase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOYA-OSIGUWA, S. A; FRASER, L. R. Fertilization promoting peptide and adenosine, acting as first messengers, regulate cAMP production and consequent protein tyrosine phosphorylation in a capacitation-dependent manner. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p. 384-92, 2000.

AKHTAR, M.; WRIGHT, J. N.; LEE-ROBICHAUD, P. A review of mechanistic studies on aromatase (CYP19) and 17 α -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17). **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 1-2, p. 2-12, 2011.

AQUILA, S.; SISCI, D.; GENTILE, M.; *et al.* Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 7, p. 3385-90, 2002.

ARAI, K. Y.; TANAKA, Y.; TANIYAMA, H.; *et al.* Expression of inhibins, activins, insulin-like growth factor-I and steroidogenic enzymes in the equine placenta. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 31, n. 1, p. 19-34, 2006.

AXNÉR, E. Sperm maturation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 14-24, 2006.

AXNÉR, E.; FORSBERG, C. Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 291, n. April, p. 282-291, 2007.

BAUDI, D. L. K.; JEWGENOW, K.; PUKAZHENTHI, B.S.; *et al.* Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 204-11, 2008.

BILIŃSKA, B.; SCHMALZ-FRACZEK, B.; SADOWSKA, J.; *et al.* Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors alpha and beta in testicular cells--an immunohistochemical study of the bank vole. **Acta Histochemica**, v. 102, n. 2, p. 167-81, 2000.

BILIŃSKA, B.; SCHMALZ-FRACZEK, B.; KOTULA, M; CARREAU, S. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, n. 1-2, p. 189-198, 2001.

BLOTTNER, S.; ROELANTS, H.; WAGENER, A.; WENZEL, U.D. Testicular mitosis, meiosis and apoptosis in mink (*Mustela vison*) during breeding and non-breeding seasons. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 3-4, p. 237-249, 1999.

BLOTTNER, S.; HINGST, O.; MEYER, H. H. Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, n. 2, p. 299-305, 1996.

BLOTTNER, S.; JEWGENOW, K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 42, n. 5, p. 536-40, 2007.

BLOTTNER, S.; SCHÖN, J.; ROELANTS, H. Apoptosis is not the cause of seasonal testicular involution in roe deer. **Cell and Tissue Research**, v. 327, n. 3, p. 615-24, 2007.

BOUSKINE, A.; NEBOUT, M.; MOGRABI, B.; *et al.* Estrogens promote human testicular germ cell cancer through a membrane-mediated activation of extracellular regulated kinase and protein kinase A. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 565-73, 2008.

BRONSON, F. H. Mammalian reproduction: an ecological perspective. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 1, p. 1-26, 1985.

BROWN, J.; WALKER, S.E.; STEINMAIN, K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species**. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia - EUA, 2004.

BROWN, J. L. Female reproductive cycles of wild female felids. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 155-62, 2011.

BULUN, S. E.; SEBASTIAN, S.; TAKAYAMA, K.; *et al.* The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3-5, p. 219-224, 2003.

BYERS, A. P.; HUNTER, A.G.; SEAL, U.S.; *et al.* Effect of season on seminal traits and serum hormone concentrations in captive male Siberian tigers (*Panthera tigris*). **Reproduction**, v. 90, n. 1, p. 119-125, 1990.

CARANI, C.; QIN, K.; SOMONI, M.; *et al.* Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 2, p. 91-5, 1997.

CARREAU, S. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, n. 1-2, p. 65-72, 2001.

CARREAU, S.; BOURGUIBA, S.; LAMBARD, S.; *et al.* Reproductive system: aromatase and estrogens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 193, n. 1-2, p. 137-43, 2002.

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALANDE, C.; *et al.* Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 35, 2003.

CARREAU, S.; DELALANDE, C.; GALERAUD-DENIS, I. Mammalian sperm quality and aromatase expression. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, n. 8, p. 552-7, 2009.

CARREAU, S.; HESS, R. A. Oestrogens and spermatogenesis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1517-35, 2010.

CARREAU, S.; WOLCZYNSKI, S.; GALERAUD-DENIS, I. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1571-9, 2010.

CARREAU, S.; BOIS, C.; ZANATTA, L.; *et al.* Estrogen signaling in testicular cells. **Life Sciences**, v. 89, n. 15-16, p. 584-7, 2011.

CARREAU, S.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogens: new players in spermatogenesis. **Reproductive Biology**, v. 11, n. 3, p. 174-93, 2011.

CHEMINEAU, P.; GUILLAUME, D.; MIGAUD, M.; *et al.* Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 43 Suppl 2, p. 40-7, 2008.

CHEN, D.; REIERSTAD, S.; LU, M.; *et al.* Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. **Cancer Letters**, v. 273, n. 1, p. 15-27, 2009.

CHENG, C. Y.; WONG, E.W.P.; YAN, H.H.N.; MRUK, D.D. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 315, n. 1-2, p. 49-56, 2010.

CONLEY, A J.; CORBIN, C.J.; HINSHELWOOD, M.M.; *et al.* Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 2, p. 497-505, 1996.

CONLEY, A. Mammalian aromatases. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 685-695, 2001.

CONLEY, A. J.; HOWARD, H.J.; SLANGER, W.D.; *et al.* Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 4, p. 655-61, 1994.

COOPER, T. G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 1, p. 130-8, 2011.

COOPER, T. G.; YEUNG, C.-H. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 28-38, 2003.

CORBIN, C. J.; KHALIL, M. W.; CONLEY, A J. Functional ovarian and placental isoforms of porcine aromatase. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 113, n. 1, p. 29-37, 1995.

CORRE, L. LE; CHALABI, N.; DELORT, L.; *et al.* Review Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 462-471, 2005.

COUSE, J. F. Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α (ER α) and Estrogen Receptor- β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER α -Knockout Mouse. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 4613-4621, 1997.

D'SOUZA, R.; GILL-SHARMA, M.K.; PATHAK, S.; *et al.* Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 241, n. 1-2, p. 41-8, 2005.

DONNELL, L. O.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and Spermatogenesis*. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.

DONNELL, L.O.; MEACHEM, S.J.; STANTON, P.G.; MCLACHALN,R. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 3th edition, Elsevier, 2006, p. 1017 - 54.

EIZIRIK, E.; BONATTO, S.L.; JOHNSON, W.E.; *et al.* Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, felidae). **Journal of Molecular Evolution**, v. 47, n. 5, p. 613-24, 1998.

ERICKSON, G. F.; DANFORTH, D. R. Ovarian control of follicle development. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, n. 2, p. 736-747, 1995.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 375-87, 2000.

FISHER, J.S.; TURNER, K.J.; FRASER, H.M. *et al.* Immunoexpression of aquaporin-1 in the efferent ducts of the rat and marmoset monkey during development, its modulation by estrogens, and its possible role in fluid resorption. **Endocrinology**, v. 139, n. 9, 1998.

FRANÇA, L. R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R.; *et al.* Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1371-7, 1998.

FRANÇA, L. R.; GODINHO, C. L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1554-61, 2003.

FRASER, L. R.; BEYRET, E.; MILLIGAN, S.R.; ADEOYA-OSIGUWA, A. Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 21, n. 5, p. 1184-93, 2006.

GAILLARD, J. L.; SILBERZAHN, P. Aromatization of 19-norandrogens by equine testicular microsomes. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5717-22, 1987.

GERAUDIE, P.; HINFRAY, N.; GERBRON, M.; PORCHER, J.; *et al.* Brain cytochrome P450 aromatase activity in roach (*Rutilus rutilus*): seasonal variations and impact of environmental contaminants. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 105, n. 3-4, p. 378-84, 2011.

GHOSH, D.; GRISWOLD, J.; ERMAN, M.; PANGBORN, W. X-ray structure of human aromatase reveals an androgen-specific active site. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 4-5, p. 197-202, 2010.

GOERITZ, F.; QUEST, M.; WAGENER, A.; *et al.* Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1487-1502, 2003.

GREGORIOU, O.; BAKAS, P.; GRIGORIADIS, C.; *et al.* Changes in hormonal profile and seminal parameters with use of aromatase inhibitors in management of infertile men with low testosterone to estradiol ratios. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 1, p. 48-51, 2012.

GRISWOLD, M. D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 2, p. 211-6, 1995.

GUENGERICH, F. P.; SOHL, C. D.; CHOWDHURY, G. Multi-step oxidations catalyzed by cytochrome P450 enzymes: Processive vs. distributive kinetics and the issue of carbonyl oxidation in chemical mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 507, n. 1, p. 126-34, 2011.

HANDELSMAN, D. J. Myth and methodology in the evaluation of human sperm output. **International Journal of Andrology**, v. 23, Suppl 2, n. 2000, p. 50-3, 2000.

HARADA, N. Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 61, n. 3-6, p. 175-84, 1997.

HARADA, N.; UTSUMI, T.; TAKAGI, Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11312-6, 1993.

HEJMEJ, A.; GORAZD, M.; KOSINIAK-KAMYSZ, K.; *et al.* Expression of aromatase and oestrogen receptors in reproductive tissues of the stallion and a single cryptorchid visualised by means of immunohistochemistry. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 3, p. 534-47, 2005.

HESS, R. A. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 2, p. 84-92, 2000.

HESS, R. A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 52, 2003.

HESS, R. A.; BUNICK, D.; BAHR, J. M. Sperm, a source of estrogen. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 12, p. 59-62, 1995.

HOOVER, E.A.; ZEIDNER, N.S.; PERIGO, N.A.; *et al.* Feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome in cats as a model for evaluation of antiretroviral therapy. **Intervirolgy**, v. 30, p. 12 - 25, 1989.

HOWARD, J. G.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; *et al.* Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 3, p. 204-15, 1990.

ICHIKAWA, T. [A study on intratesticular aromatase activity in male infertility]. **Nihon Hinyōkika Gakkai zasshi. The Japanese Journal of Urology**, v. 86, n. 4, p. 940-8, 1995.

JEWGENOW, K.; NEUBAUER, K.; BLOTTNER, S.; *et al.* Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the teratospermic domestic cat. **Journal of Andrology**, v. 30, n. 4, p. 460-8, 2009.

JEWGENOW, K.; PUKAZHENTHI, B. S.; SCHOEN, J. Analysis of Sertoli cell efficiency allows the differentiation between two fundamentally different forms of feline teratospermia. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 261-6, 2013.

JOHN-BAPTISTE, A. A.; WU, W.; ROCHON, P.; *et al.* A Systematic Review and Methodological Evaluation of Published Cost-Effectiveness Analyses of Aromatase Inhibitors versus Tamoxifen in Early Stage Breast Cancer. **PLOS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

JOHNSTON, L. A.; ARMSTRONG, D. L.; BROWN, J. L. Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). **Reproduction**, v. 102, n. 1, p. 229-236, 1994.

JOHNSTONE, I.; BANCROFT, B.; MCFARLANE, J. Testosterone and androstenedione profiles in the blood of domestic tom-cats. **Animal Reproduction Science**, v. 7, n. 4, p. 363-375, 1984.

KAWAKAMI, E.; HIRANO, T.; HORI, T.; *et al.* Improvement in spermatogenic function after subcutaneous implantation of a capsule containing an aromatase inhibitor in four oligozoospermic dogs and one azoospermic dog with high plasma estradiol-17beta concentrations. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 165-78, 2004.

KERR, J.B.; LOVELAND, K.L.; O'BRYAN, M.K.; KRETZER, D.M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 3th edition, Elsevier, 2006, p. 827 - 920.

KIRKPATRICK, J. Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, p. 1285 - 1287, 1985.

KOPERA, I.; SZCZEPANOWICZ, M.; GIZEJEWSKI, Z.; *et al.* Immunoexpression of aromatase in immature and adult males of the European bison (*Bison bonasus*,

Linnaeus 1758). **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 45, n. 2, p. 269-74, 2010.

LARDONE, M. C.; CASTILLO, P.; VALDEVENITO, R.; *et al.* P450-aromatase activity and expression in human testicular tissues with severe spermatogenic failure. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 4, p. 650-60, 2010.

LEA, C. K.; EBRAHIM, H.; TENNANT, S.; *et al.* Aromatase cytochrome P450 transcripts are detected in fractured human bone but not in normal skeletal tissue. **Bone**, v. 21, n. 5, p. 433-40, 1997.

LEPHART, E. D.; SIMPSON, E. R. Assay of aromatase activity. **Methods in Enzymology**, v. 206, n. 1976, p. 477-83, 1991.

LEWIS-WAMBI, J. S.; JORDAN, V. C. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 206, 2009.

LI, X.; NOKKALA, E.; YAN, W.; *et al.* Altered structure and function of reproductive organs in transgenic male mice overexpressing human aromatase. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2435-42, 2001.

LI, X.; RAHMAN, N. Impact of androgen/estrogen ratio: lessons learned from the aromatase over-expression mice. **General and Comparative Endocrinology**, v. 159, n. 1, p. 1-9, 2008.

LINDBURG, D.G.; DURRANT, B.S.; MILLARD, S.E.; OOSTERHUIS, J.E. Fertility assessment of cheetah males with poor quality semen. **Zoo Biology**, v. 12, p. 97 - 103, 1993.

LONG, J. A.; WILDT, D.E.; WOLFE, B.A.; *et al.* Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction Are Compromised in Teratospermic Domestic Cats. **Biology of Reproduction**, v. 646, n. 54, p. 638-646, 1996.

LUBAHN, D. B.; MOYER, J.; GOLDING, T.; *et al.* Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11162-6, 1993.

MALPAUX, B. Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. In: NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 3th edition, Elsevier, 2006, p. 2231 - 2267.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; MORAIS, R.N.; BOTELHO, G.G.K.; *et al.* Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. **International Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 704-12, 2009.

MAZUR, P.; KOSHIMOTO, C. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1485-90, 2002.

MCLACHLAN, R. I.; DONNELL, L.; MEACHEM, S.; *et al.* Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 149-79, 2002.

MERLOTTI, D.; GENNARI, L.; STOLAKIS, K.; *et al.* Aromatase activity and bone loss in men. **Journal of Osteoporosis**, v. 2011, p. 230671, 2011.

MEROLA, M. A reassessment of homozygosity and the case for inbreeding depression in the cheetah, *Acinonyx jubatus*: implications for conservation. **Conservation Biology**, v. 8, p. 961 - 971, 1994.

MICHAEL, M. D.; MICHAEL, L. F.; SIMPSON, E. R. A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 134, n. 2, p. 147-56, 1997.

MORAIS, R.N. **Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758; *Leopardus wiedii*, Schinz, 1821; e *Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775): Sobre a função testicular (gametogênica e esteridogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais**. São Paulo, 2000. 177 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal.

MORAIS, R. N.; MUCCIOLO, R.; GOMES, M.; *et al.* Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2027-41, 2002.

MORAN, F. M. Regulation of Microsomal P450, Redox Partner Proteins, and Steroidogenesis in the Developing Testes of the Neonatal Pig. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3361-3369, 2002.

MÜLLER, G.; MARTINO-ANDRADE, A.; SANTOS, A.; *et al.* Testicular testosterone: Estradiol ratio in domestic cats and its relationship to spermatogenesis and epididymal sperm morphology. **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1224-34, 2012.

MUNRO, C. J.; STABENFELDT, G.; CRAGUN, J.; *et al.* Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 6, p. 838-44, 1991.

NAWATA, H.; TANAKA, S.; TAKAYANAGI, R.; *et al.* Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, n. 1-6, p. 165-74, 1995.

NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; BLOTTNER, S.; *et al.* Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1517-24, 2004.

NEWELL-FUGATE, A.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; BROWN, J.; *et al.* Seminal and endocrine characteristics of male Pallas' Cats (*Otocolobus manul*) maintained under artificial lighting with simulated natural photoperiods. **Zoo biology**, v. 26, n. 3, p. 187-99, 2007.

NIE, R.; ZHOU, Q.; JASSIM, E. Differential Expression of Estrogen Receptors α and β in the Reproductive Tracts of Adult Male Dogs and Cats. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1161-8, 2002.

NOWELL, K. Revision of the Felidae Red List of threatened species. **Cat News**, p. 4-7, 2002.

NOWELL, K. Cats on the 2009 Red List of Threatened Species. **Cat News**, n. 51, Autumn, p. 31 - 33, 2009.

NUÑEZ-FAVRE, R.; BONAURA, M.; TITTARELLI, C.; *et al.* Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis silvestris catus*). **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47, Suppl 6, p. 232-4, 2012.

ODUM, J.; ASHBY, J. Detection of aromatase inhibitors in vitro using rat ovary microsomes. **Toxicology Letters**, v. 129, n. 1-2, p. 119-22, 2002.

PAK, T. R. Estrogen Accelerates Gonadal Recrudescence in Photo-Regressed Male Siberian Hamsters. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 4131-4134, 2002.

PASQUIER, G.; RIVES, N.; BOUZOUITA, A.; *et al.* [Comparison of oestradiol and testosterone levels in peripheral blood and spermatic cord blood in patients with secretory azoospermia.] **Progrès en Urologie**, v. 18, p. 663 - 668, 2008.

PAVLOVICH, C.P.; KING, P.; GOLDSTEIN, M.; *et al.* Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. **The Journal of Urology**, v. 165, n. 3, p. 837-841, 2001.

PENTIKÄINEN, V.; ERKKILÄ, K.; SUOMALAINEN, L.; *et al.* Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 5, p. 2057-67, 2000.

POINTIS, G.; FIORINI, C.; DEFAMIE, N.; SEGRETAIN, D. Gap junctional communication in the male reproductive system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1719, n. 1-2, p. 102-16, 2005.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 715-26, 2011.

PUKAZHENTHI, B.; NOILES, E.; PELICAN, K.; *et al.* Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. **Cryobiology**, v. 40, n. 2, p. 139-50, 2000.

PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 57, p. 423 - 433, 2001.

PUKAZHENTHI, B. ; SPINDLER, R.; WILDT, D.; *et al.* Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 44, n. 3, p. 288-300, 2002.

PUKAZHENTHI, B. S. ; NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; *et al.* The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 112-21, 2006.

RAESIDE, J. I.; RENAUD, R. L. Estrogen and androgen production by purified Leydig cells of mature boars. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 3, p. 727-33, 1983.

REED, K. E. N. C.; OHNO, S. Properties of Human Placental Aromatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 6, p. 1625 - 31, 1976.

RISBRIDGER, G. P.; TAYLOR, R. A. Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland , Seminal Vesicles , and Bulbourethral Glands. In: NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 3th edition, Elsevier, 2006, p. 1149 - 1166.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M.C. The Epididymis. In: NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 3th edition, Elsevier, 2006, p. 1072 - 1120.

ROBERTSON, K. M.; DONNELL, L.; JONES, M.; *et al.* Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 7986-91, 1999.

ROBERTSON, K. M. The Phenotype of the Aromatase Knockout Mouse Reveals Dietary Phytoestrogens Impact Significantly on Testis Function. **Endocrinology**, v. 143, n. 8, p. 2913-2921, 2002.

ROBINSON, R.; COX, H. W. Reproductive performance in a cat colony over a 10-year period. **Laboratory Animals**, v. 4, n. 1, p. 99-112, 1970.

ROCHIRA, V.; GRANATA, A.; MADEO, B.; *et al.* Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years? **Asian Journal of Andrology**, v. 7, n. 1, p. 3-20, 2005.

ROELKE, M. E.; MARTENSON, J. S.; O'BRIEN, S. J. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. **Current Biology**, v. 3, n. 6, p. 340-350, 1993.

ROGER, C.; LAMBARD, S.; BOUSKINE, A.; *et al.* Estrogen-induced growth inhibition of human seminoma cells expressing estrogen receptor beta and aromatase. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 35, n. 1, p. 191-9, 2005.

SATOH, K.; NONAKA, R.; ISHIKAWA, F.; *et al.* In vitro screening assay for detecting aromatase activity using rat ovarian microsomes and estrone ELISA. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 357-62, 2008.

SAYLAM, B.; EFESYOY, O.; CAYAN, S. The effect of aromatase inhibitor letrozole on body mass index, serum hormones, and sperm parameters in infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 2, p. 809-11, 2011.

SCHATZMAN, G. L.; LAUGHLIN, M. E.; BLOHM, T. R. A normal phase high-performance liquid chromatography system for steroid lyase (cytochrome P-45021SCC) assays. **Analytical Biochemistry**, v. 175, n. 1, p. 219-226, 1988.

SCHLEGEL, P. N. Aromatase inhibitors for male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 6, p. 1359-62, 2012.

SCHÖN, J.; BLOTTNER, S. Estrogens are involved in seasonal regulation of spermatogenesis and sperm maturation in roe deer (*Capreolus capreolus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 159, n. 2-3, p. 257-63, 2008.

SCHÖN, J.; NEUMANN, S.; WILDT, D.E.; *et al.* Localization of oestrogen receptors in the epididymis during sexual maturation of domestic cat. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, n. 2., p. 294 - 301, 2009.

SETCHELL, B. P. Domestication and reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 1-4, p. 195-202, 1992.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 2nd edition. New York: Raven Press, 1994, p. 1363 - 1434.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **The Lancet**, v. 341, n. 8857, p. 1392-1396, 1993.

SHARPE, R.M. The 'oestrogen hypothesis' - where do we stand now? **International Journal of Andrology**, v. 26, p. 2 - 15, 2003.

SHOZU, M.; SIMPSON, E. R. Aromatase expression of human osteoblast-like cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 139, n. 1-2, p. 117-29, 1998.

SIMPSON, E.; MAHENDROO, M. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342-355, 1994.

SIMPSON, E. R.; CLYNE, C.; RUBIN, G.; *et al.* Aromatase--a brief overview. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p. 93-127, 2002.

SKAKKEBAEK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. **International Journal of Andrology**, v. 27, n. 4, p. 189-91, 2004.

SMITH, E.P.; BOYD, M.D.J.; FRANK, G.R.; *et al.* Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 1056 - 61, 1994.

SPINDLER, R. E.; WILDT, D. E. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic Cat. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 188-94, 1999.

STORNELLI, M. A.; REYNA, J.; STORNELLI M.C.; *et al.* Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats (*Felis catus*). **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 44, Suppl 2, p. 287-90, 2009.

SWANSON, W. F.; JOHNSON, W.; CAMBRE, R.; *et al.* Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biology**, v. 22, n. 5, p. 421-441, 2003.

TERRELL, K. A.; WILDT, D.; ANTHONY, N.; *et al.* Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa. **Cryobiology**, v. 64, n. 2, p. 110-7, 2012.

THOMPSON, E. A.; SIITERI, P. K. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 17, p. 5364-72, 1974.

TOPPARI, J.; LARSEN, J.C.; CHRISTIANSEN, P.; *et al.* Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspective**, v. 104, p. 741 - 803, 1996.

TOYONAGA, M.; KAIHARA, A.; TSUTSUI, T. The quality of cryopreserved sperm collected from feline caudal epididymides stored at room temperature. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 73, n. 10, p. 1395-8, 2011.

TSUTSUI, T.; ONODERA, F.; OBA, H.; *et al.* Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding seasons. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 44, Suppl 2, p. 291-3, 2009.

VAN MEEUWEN, J. A.; NIJMEIJER, S.; MUTARAPAT, T.; *et al.* Aromatase inhibition by synthetic lactones and flavonoids in human placental microsomes and breast fibroblasts--a comparative study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, n. 3, p. 269-76, 2008.

VANSELOW, J.; FÜRBASS, R.; ZSOLNAI, A.; *et al.* Expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene in cattle and sheep. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 79, n. 1-5, p. 279-88, 2001.

WILDT, D. E.; BUSH, M.; HOWARD, J.; *et al.* Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v. 29, n. 4, p. 1019-25, 1983.

WILDT, D. E.; HOWARD, J.G.; CHAKRABORTY, P.K.; BUSH, M. Reproductive physiology of the clouded leopard: I. Electroejaculates contain high proportions of pleiomorphic spermatozoa throughout the year. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 5, p. 937-47, 1986.

WILDT, D. E.; CARO, T.; O'BRIEN, S.; *et al.* Similarity in Ejaculate-Endocrine Characteristics in Captive Versus Free-Ranging Cheetahs of Two Subspecies. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 351-360, 1987.

WILDT, D. E.; PHILIPS, L.; SIMMONS, L.; *et al.* A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard, and puma. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 2, p. 245-55, 1988.

WILSON, J. Y.; MCARTHUR, A. G.; STEGEMAN, J. J. Characterization of a cetacean aromatase (CYP19) and the phylogeny and functional conservation of vertebrate aromatase. **General and Comparative Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 74-83, 2005.

ZENG, Z. J.; LI, J.; ZHANG, Y.; *et al.* Optimal combination of radiotherapy and endocrine drugs in breast cancer treatment. **Cancer Radiotherapie : Journal de la Societe Francaise de Radiotherapie Oncologique**, p. 1-7, 2013.

ZHANG, H.; SHENG, X.; HU, X.; *et al.* Seasonal changes in spermatogenesis and immunolocalization of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/c17-20 lyase and cytochrome P450 aromatase in the wild male ground squirrel (*Citellus dauricus* Brandt). **The Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 3, p. 297-302, 2010.

ZHAO, Y.; MENDELSON, C.R.; SIMPSON, E.R. Characterization of the sequence of the human CYP19 (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. 3, p. 340 - 9, 1995.

ZHOU, Q.; CLARKE, L.; NIE, R.; *et al.* Estrogen action and male fertility: Roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 14132 - 37, 2001.